

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1927

N°

4

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1927

PAR

PIERRE DESCOMBEY

de l'Institut Pasteur
né le 22 Avril 1895 à Périgueux (Dordogne)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PROPHYLAXIE DU TÉTANOS

L'IMMUNISATION ACTIVE CONTRE LE TÉTANOS

PAR

L'ANATOXINE TÉTANIQUE

JURY { *Président :* M. LEMIERRE , professeur à la Faculté de Médecine.
Assesseurs : { M. VALLÉE } professeurs à l'École Nationale vétérinaire d'Alfort.
 { M. PANISSET }

LE PUY-EN-VELAY

IMPRIMERIE « LA HAUTE-LOIRE »

23, BOULEVARD CARNOT, 23

1927

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1927

N°

4

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1927

PAR

PIERRE DESCOMBEY

de l'Institut Pasteur
né le 22 Avril 1895 à Périgueux (Dordogne)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PROPHYLAXIE DU TÉTANOS

L'IMMUNISATION ACTIVE CONTRE LE TÉTANOS

PAR

L'ANATOXINE TÉTANIQUE

JURY { *Président* : M. LEMIERRE , professeur à la Faculté de Médecine.
 { *Assesseurs* : { M. VALLÉE } professeurs à l'École Nationale vétérinaire d'Alfort.
 { M. PANISSET }

LE PUY-EN-VELAY

IMPRIMERIE « LA HAUTE-LOIRE »

23, BOULEVARD CARNOT, 23

1927

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE.

Directeur : M. E. NICOLAS.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire des Ecoles vétérinaires, P.-J. CADIOT, A. RAILLIET, H. VALLÉE.

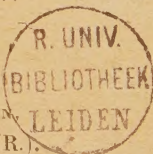
PROFESSEURS

	MM.
Anatomie descriptive des mammifères domestiques.....	BRESSOU
Physiologie, thérapeutique générale, matière médicale.....	MAIGNON
Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie.....	NICOLAS
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique; histoire naturelle médicale.....	HENRY
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique; sémologie et propédeutique, jurisprudence.....	ROBIN
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique; anatomie chirurgicale, médecine opératoire et ferrure	COQUOT
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique; médecine opératoire, obstétrique.....	MOUSSU
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique.....	PANISSET
Histologie et embryologie, anatomie pathologique, inspection des denrées alimentaires, autopsies.....	PETIT
Hygiène et agronomie; zootechnie et économie rurale.....	DECHAMBRE

CHEFS DE TRAVAUX

MM. DELMER.
LEBLOIS.
LESBOUYRIES.

MM. MONVOISIN.
MOUSSU (R.).
VERGE



La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MA FEMME

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
I. — AVANT-PROPOS.	1
II. — INTRODUCTION. — Pourquoi tenter l'immunisation active contre le tétanos.	3
III. — APERÇU GÉNÉRAL SUR LES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'IMMUNISATION CONTRE LE TÉTANOS. — a) Antigènes purs ; b) Antigènes modifiés par des agents physiques ; c) Antigènes modifiés par des agents chimiques ; d) Antigènes modifiés par un agent spécifique ; e) Examen de ces procédés ; f) Tentatives de prophylaxie du tétanos par la vaccination.	6
IV — L'ANATOXINE TÉTANIQUE. — a) Définition ; b) La floculation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine tétaniques : temps de floculation ; taux de floculation, toxicité, pouvoir antigène ; c) Préparation de l'anatoxine ; d) Innocuité ; e) Pouvoir antigène : pouvoir floculant et pouvoir antigène ; pas de pouvoir antigène sans pouvoir floculant ; influence du taux de floculation ; influence du temps de floculation ; f) Stabilité ; g) Anatoxines et toxoïdes.	15
V. — IMMUNISATION DU COBAYE. — a) Influence de la dose d'antigène ; b) Influence du temps écoulé depuis la vaccination ; c) Influence de la répétition des injections ; d) Influence de la voie	

d'introduction de l'antigène ; f) Comparaison entre l'anatoxine tétanique et divers autres antigènes : toxines chauffées, toxines iodées, mélanges toxine-antitoxine.	36
VI. — IMMUNISATION DU CHEVAL. — a) Résistance à l'épreuve expérimentale : 1 ^o épreuve par la toxine pure ; 2 ^o épreuve par l'insertion d'échardes tétaniques ; b) Contrôle de l'immunité par la recherche de l'antitoxine dans les humeurs des vaccinés ; c) Délais d'apparition de l'antitoxine dans les humeurs ; d) Durée de l'immunité ; e) Influence de divers facteurs sur l'immunisation du cheval : 1 ^o L'antigène et son mode d'utilisation, la dose, la répétition des injections, le délai ménagé entre les injections, la nature de l'antigène et son action locale ; 2 ^o L'organisme : l'âge, l'état de santé, les antécédents morbides, les vaccinations antérieures, les injections de sérum antitétanique ; 3 ^o Le milieu : la température ; f) Indications générales relatives à la vaccination des solipèdes ; g) Technique de cette vaccination. . .	49
VII. — CONCLUSIONS.	81
VIII. — BIBLIOGRAPHIE.	85

I

AVANT-PROPOS

Cette étude de l'immunisation antitétanique a été réalisée au Service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur (Annexe de Garches) auquel nous sommes attaché depuis cinq années.

Bien que les laboratoires de Garches constituent un service essentiellement pratique, la spéculation scientifique n'y est pas interdite et l'accomplissement du travail de chaque jour permet d'y faire des observations multiples, d'un intérêt théorique parfois considérable. Mettant à profit les nombreuses possibilités d'étude qui nous étaient offertes, nous avons consacré les heures de loisir que nous laisse notre service à la réalisation de ce travail. Il consiste, à part quelques considérations historiques, en l'exposé de recherches expérimentales originales. Les unes ont fait l'objet de diverses publications (1924-25 et 26), les autres sont encore inédites. Il s'agit donc d'une synthèse de nos recherches, dans laquelle nous nous sommes efforcé de résoudre, dans ses points essentiels, le double problème de la préparation d'un vaccin antitétanique et de son emploi pour l'immunisation des animaux.

Cette tâche, dont la réalisation n'aurait pu être tentée sans les récentes découvertes de RAMON, dont elle ne constitue qu'une application, ne pouvait être menée à bien qu'à la condition, pour nous, de posséder les plus larges possibilités d'expérimentation et d'avoir à notre disposition de très nombreux animaux

d'expérience et surtout des toxines tétaniques très actives. Nous devons donc remercier ici, très vivement, notre maître M. le docteur E. ROUX, qui nous a laissé tenter sur l'animal les expériences nécessaires et qui, surtout, nous a guidé toujours de la façon la plus bienveillante et la plus sûre en nous prodiguant de très utiles conseils ; notre chef de service, M. le Docteur Louis MARTIN, grâce auquel nous avons toujours eu à notre disposition, et en abondance, le matériel nécessaire et notamment les toxines indispensables à nos recherches. Ces toxines sont préparées dans son laboratoire par M. le Docteur LOISEAU avec l'aide de M. V. GIDON. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous nous faisons enfin un devoir de remercier tous ceux qui nous ont aidé dans notre tâche : notre collègue G. RAMON qui en fut l'inspirateur et en qui nous avons trouvé un maître remarquable, M. le Docteur LEGROUX, qui a mis à notre disposition les ressources de son laboratoire, M. le Professeur VAL-LÉE, notre maître, qui, non seulement fut pour nous le guide le plus bienveillant et le plus averti, mais encore nous a honoré d'une amitié d'un prix inestimable pour nous.

II

INTRODUCTION

POURQUOI TENTER L'IMMUNISATION ACTIVE CONTRE LE TÉTANOS

Le tétanos est une maladie toxi-infectieuse provoquée, dans les conditions naturelles, par la formation en un point quelconque, mais toujours très circonscrit de l'organisme, d'une toxine sécrétée par un agent spécifique, le bacille du tétanos ou bacille de NICOLAÏER.

D'origine tellurique, de fréquence variable suivant les régions, suivant les espèces, suivant la profession chez l'homme, suivant le service chez les animaux, le tétanos est une maladie toujours grave et, le plus généralement, mortelle. Il est justiciable cependant d'un traitement préventif, spécifique, la sérothérapie antitoxique, qui a constitué, jusqu'à ce jour, la seule thérapeutique préventive du tétanos.

En dépit des âpres critiques dont elle fut l'objet à son début, la sérothérapie antitétanique ne tarda pas à s'imposer. Elle eut, des adeptes fervents et d'ardents apôtres. Ce furent, notamment, P. BAZY, GUINARD et,

surtout et avant tous autres, NOCARD, qui, par ses interventions, décida vétérinaires et médecins à faire usage du sérum antitétanique. En même temps qu'il employait son talent à convaincre, sur des données irrécusables, ses confrères, puis les médecins, il contribuait à jeter les bases du service de sérothérapie de Garches dont l'importance n'a fait que s'accroître depuis. Le temps devait se charger, en effet, mieux que toutes les statistiques, de mettre en relief toute la valeur de la sérothérapie antitétanique.

Etant donnée l'efficacité de ce mode de prophylaxie, il peut sembler vain de prétendre lui substituer la pratique de l'immunisation active. Il peut sembler même, et la chose a été soutenue récemment encore, qu'il n'y ait guère à attendre d'une vaccination antitétanique, alors qu'il est admis, de nombreuses observations en font foi, qu'une atteinte même très grave de tétanos ne laisse aux organismes qui en ont triomphé aucune trace appréciable d'immunité. Nous établirons, cependant, au cours de ce travail, qu'il est possible de conférer aux animaux une immunité antitétanique active durable. Cette notion est parfaitement conciliable avec les possibilités de récives du tétanos et nous ferons valoir les raisons qui nous imposent cette façon de voir.

De réalisation aisée, la vaccination antitétanique présente certains avantages d'ordre général que nous allons exposer en quelques mots :

Alors que la résistance conférée par la sérothérapie ne saurait jamais être que transitoire, celle qui résulte d'une vaccination est durable. Ceci permet, chez certains sujets particulièrement exposés à contracter le tétanos, de créer une immunité en quelque sorte permanente sans avoir à répéter, à intervalles souvent très rapprochés, les injections de sérum antitétanique ;

Par le fait même qu'elle est acquise pour longtemps

et d'avance, cette résistance, toujours prête à entrer en jeu, est supérieure à celle que confère la sérothérapie, intervention d'urgence qui reste parfois sans effet, en particulier quand elle est pratiquée trop tardivement;

La vaccination permet, en outre, d'éliminer tous les cas de tétanos dit « *médical* » ou « *spontané* » auxquels la sérothérapie ne saurait être opposée préventivement;

Enfin les vaccinations et revaccinations successives ne peuvent que renforcer l'immunité, tandis que les injections répétées de sérum, antitétanique ou autre, chez un même sujet, ont pour effet de rendre la sérothérapie de moins en moins efficace, l'organisme acquérant la propriété de se débarrasser d'autant plus vite du serum qu'il en a reçu plus souvent.

Nous préciserons, au cours de cet exposé, les cas dans lesquels la vaccination nous semble le plus particulièrement indiquée.

III

APERÇU GÉNÉRAL SUR LES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'IMMUNISATION CONTRE LE TÉTANOS

Les recherches relatives à l'immunisation contre le tétanos entrent dans la voie des réalisations avec BEHRING et KITASATO en 1890. Dès cette date, de nombreux chercheurs s'appliquent à résoudre ce problème. Ils emploient, à cet effet, soit des cultures pures, soit, le plus souvent, des cultures dépouillées de tout germe par filtration et que l'on désigne sous le nom de toxine tétanique. A la lecture de leurs travaux, apparaît très nettement la difficulté et, le plus souvent, l'impossibilité presque absolue de mener à bien l'immunisation au moyen de cultures et même de toxines pures; la toxicité de ces produits est tellement grande, en effet, qu'il faut, si l'on veut se tenir au dessous des doses pathogènes ou même de la dose mortelle, en employer *des quantités excessivement réduites dont le pouvoir antigène est pratiquement nul*. Bien plus, de telles doses ne font que

créer, chez les animaux qui les reçoivent, un état bien connu d'*hypersensibilité*. C'est ainsi qu'un cobaye, guéri d'un tétanos expérimental provoqué par l'injection d'une dose infra-mortelle de toxine tétanique, est non seulement aussi sensible, mais encore, généralement, bien plus sensible qu'un sujet neuf de même espèce à une nouvelle atteinte de la maladie. (VAILLARD.) Cette hypersensibilité semble être une règle quasi-absolue chez le cheval (1).

Devant la nécessité d'employer cultures ou toxines à des doses assez élevées, devant les difficultés, parfois surmontées cependant, que présente leur emploi à l'état pur, les expérimentateurs ont cherché à en réduire plus ou moins la toxicité. Tous les procédés pratiques d'immunisation contre le tétanos reposent sur ce commun principe, *qu'on peut enlever à une culture ou à une toxine, tout ou partie de sa nocivité en respectant, dans une certaine mesure, son aptitude à faire apparaître des anticorps dans l'organisme*. C'est ainsi que cultures et toxines ont été traitées tour à tour par un nombre considérable d'agents physiques, chimiques, ou spécifiques. Nous allons rappeler très sommairement les principaux procédés d'immunisation employés jusqu'à ce jour.

a) ANTIGÈNES PURS

Nous avons signalé les difficultés que soulève l'emploi de produits purs. L'immunisation antitétanique, impos-

(1) Les sujets chez lesquels on observe des récidives du tétanos se trouvent dans le cas d'un animal soumis à l'injection d'une dose infra-mortelle de toxine et dont la sensibilité reste entière ou s'accroît après guérison. Mais cette possibilité des récidives du tétanos n'exclut pas celle de créer, chez l'homme ou chez l'animal, une immunité active persistante. Pour réaliser celle-ci, il suffit, nous le verrons, d'employer à bon escient des doses suffisantes d'antigène.

sible à réaliser au moyen de cultures pures, a pu, par contre, être menée à bien soit au moyen de corps microbiens ou de spores, soit au moyen de toxine tétanique pure. Notons, cependant, que de tels résultats sont exceptionnels et constituent, de la part de ceux qui les ont obtenus, de véritables tours de force.

En 1892, VAILLARD constate que des sujets qui avaient reçu antérieurement soit des spores pures, privées de toxine par chauffage, soit des spores et des corps microbiens dépouillés de toxine par lavage prolongé, possèdent l'immunité. Il attribue l'apparition de celle-ci à la formation *in vivo* de faibles doses de toxine par les germes injectés. Il note, en même temps, que le serum des sujets ainsi traités n'a pas de propriétés antitoxiques décelables.

La même année, il immunise le lapin par des injections successives de doses, d'abord très faibles, puis progressivement croissantes de toxine pure. Il parvient ainsi à faire supporter à ses vaccinés jusqu'à 40 c. c. d'une toxine, mortelle pour des témoins à la dose de 0,5 c. c.

b) ANTIGÈNES MODIFIÉS PAR DES AGENTS PHYSIQUES

Nous ne considérerons ici que l'action de la chaleur. L'action de la chaleur ou de la lumière associée à celle d'un composé chimique sera traitée au paragraphe suivant.

En 1891, VAILLARD vaccine le lapin au moyen de cultures chauffées à 60° pendant une heure. Il démontre, en même temps, que les filtrats, traités de la même manière que les cultures, immunisent tout aussi bien que celles-ci et que les spores et les corps microbiens ne

jouent par eux-mêmes aucun rôle essentiel dans la production de l'immunité.

Il utilise encore, avec avantage, les injections successives de toxine chauffée à des températures progressivement décroissantes 60 - 55 - 50°. Après quoi, il injecte de la toxine pure pour renforcer le plus possible l'immunité.

C'est d'une façon tout à fait analogue qu'en 1915, MARTIN, FRASEY et SALIMBENI devaient réaliser l'immunisation du cheval. Ces auteurs ont d'ailleurs noté l'infidélité de la méthode du chauffage des toxines.

c) ANTIGÈNES MODIFIÉS PAR DES AGENTS CHIMIQUES

C'est le cas le plus général. Le nombre des produits employés pour modifier cultures et toxines est considérable : Corps simples (oxygène, chlore, iode), Acides (chlorhydrique, sulfhydrique), Sels minéraux (permanganate de potasse), Substances organiques diverses (couleurs d'aniline, sulfure de carbone, aldéhyde formique), Diastases, Extraits d'organes. L'énumération complète en serait longue et sans grand intérêt; nous ne citerons que les principaux.

En 1890, BEHRING et KITASATO annoncent qu'ils ont réussi à vacciner le lapin en lui injectant, en deux points différents, une solution de trichlorure d'iode, d'une part, une certaine quantité de culture, d'autre part. Cette action *in vivo* du trichlorure d'iode peut aussi s'effectuer *in vitro*. Le procédé s'applique indifféremment aux cultures totales ou aux toxines.

En 1891, ces résultats sont vérifiés et confirmés par VAILLARD, par TIZZONI et CATTANI, ces deux derniers auteurs ayant échoué dans leurs tentatives d'immunisation au moyen de faibles doses de cultures pures.

En 1892, BRIEGER, KITASATO et WASSERMANN vaccinent le lapin et la souris au moyen de cultures faites en milieu additionné d'extrait de thymus (de telles cultures ne donnant ni spores ni toxine).

En 1892, VAILLARD réalise l'immunisation du lapin par l'injection de cultures additionnées d'acide lactique. Il obtient, par le même procédé, mais plus difficilement, l'immunité chez le rat et chez la souris.

La même année, ROUX et VAILLARD vaccinent le lapin, le cobaye, le rat, en leur injectant, tout d'abord, des mélanges extemporanés de toxine tétanique et de liqueur de Gram, puis des doses progressivement croissantes de toxine pure.

Plus récemment, en 1909, LOWENSTEIN, soumettant la toxine à l'action simultanée de l'aldéhyde formique et de rayons lumineux, ou mieux de l'aldéhyde formique et de la chaleur, obtient un produit atoxique qui lui permet de vacciner les animaux de laboratoire et les sujets producteurs de sérum antitétanique (1).

d) ANTIGÈNES MODIFIÉS PAR UN AGENT SPÉCIFIQUE

En 1895, dans une communication à l'Académie de Médecine, BABÈS montre, le premier, que des mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques peuvent conférer une immunité active. THEOBALD SMITH, en 1909, BEHRING, en 1913, devaient revenir à cette notion, et, s'appuyant sur elle, préconiser la prophylaxie de la diphtérie par la vaccination. Par analogie, l'immunisation contre le tétanos a été réalisée, soit par

(1) L'action du formol sur la toxicité de la toxine tétanique a été signalée pour la première fois par BURCKHARD en 1895.

l'injection de mélanges de toxine et d'antitoxine, soit par injections successives, à intervalle de quelques heures, d'antitoxine d'abord, de toxine ensuite. (LOWENSTEIN 1915, BUXTON 1921).

e) EXAMEN DE CES PROCÉDÉS

Tous les procédés pratiques d'immunisation reposent, nous venons de le voir, sur ce commun principe, qu'on peut enlever à une culture ou à une toxine toute ou presque toute sa nocivité en respectant cependant, dans une certaine mesure, son pouvoir antigène. Il faut convenir toutefois, que la plupart des agents employés à cet effet respectent assez mal ce pouvoir antigène et que la préoccupation dominante de ceux qui les ont utilisés a été surtout de réduire la toxicité. C'est pourquoi les toxines ainsi traitées ne sont, en général, que de médiocres antigènes, bons, tout juste, à créer une *immunité de départ* (Gründimmunität de BEHRING) destinée à permettre l'injection, toujours prudemment effectuée, d'antigènes de plus en plus toxiques, c'est-à-dire de moins en moins modifiés. La désintégration du pouvoir antigène est, à la vérité, presque toujours aussi complète que celle du pouvoir toxique et l'action des divers agents utilisés échappe à toute analyse du fait de sa brutalité, de sa rapidité. Un progrès notable est marqué cependant par l'emploi du formol dont l'action sur la toxine tétanique est lente, progressive, ce qui permet de l'étudier aisément dans ses phases successives, de s'en rendre maître et de la doser à volonté.

La notion de mesure du pouvoir antigène des toxines, récemment établie par RAMON, puis la découverte par cet auteur de l'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE, devaient

nous permettre de reprendre, sous un jour nouveau, l'étude de l'action du formol sur la toxine tétanique et d'aboutir à la notion de l'ANATOXINE TÉTANIQUE.

f) TENTATIVES DE PROPHYLAXIE DU TÉTANOS

PAR LA VACCINATION

Pourvu d'un antigène d'activité considérable et susceptible d'être titré *in vitro*, comme nous le verrons plus loin, nous avons pensé à l'utiliser pour vacciner couramment les animaux domestiques contre le tétanos. Jusqu'à ce jour, en effet, on ne s'est guère préoccupé que de réaliser l'hyperimmunisation du cheval en vue de la production du serum antitétanique. Nous avons fait valoir déjà, au début de ce travail, les raisons qui ont fait naître dans notre esprit l'idée de substituer la vaccination à la sérothérapie. Cette idée n'est, à vrai dire, pas nouvelle et nous devons rapporter ici plusieurs tentatives de vaccination toutes antérieures à nos premières recherches.

Au cours de la dernière guerre notamment, notre maître, le Professeur VALLÉE, et le Docteur L. BAZY, frappés par l'insuffisance de la protection qu'assure la sérothérapie dans certains cas, réalisent, les premiers, en 1917, l'immunisation active de l'homme. Ils pratiquent trois injections de mélanges toxine-liqueur de Gram, neutres pour les deux premières injections, légèrement toxique pour la troisième ; ils associent, en outre, chez les blessés de guerre, la sérothérapie à la vaccination.

Plus récemment, OKUDA vaccine, au moyen de mélanges analogues, des animaux de laboratoire (lapin,

cobaye), et certaines espèces domestiques (mouton, chèvre, cheval.). Etudiant les qualités antigéniques des toxines traitées par l'iode, cet auteur ne fait que confirmer des notions classiques et déjà anciennement établies.

Mais les qualités immunisantes des toxines iodées pour réelles qu'elles soient, n'en demeurent pas moins faibles et, en quelques jours, les mélanges de toxine et de liqueur de Gram perdent toute leur activité. Ils constituent donc des antigènes toujours instables et de valeur médiocre quand ils sont *parfaitement neutres* ; d'où la nécessité de les employer à des doses assez élevées et dans les heures qui suivent leur préparation. S'ils permettent, ainsi que l'ont montré ROUX et VAILLARD, puis ROUX et MARTIN, d'entreprendre en toute sécurité l'immunisation antitoxique des animaux, c'est difficilement qu'ils pourraient être utilisés en grand pour vacciner contre le tétanos et, en réalité, ils n'ont été l'objet, jusqu'à présent, d'aucune utilisation pratique de cet ordre, à notre connaissance tout au moins.

A la suite des travaux de LOWENSTEIN, dont il fut le collaborateur, von EISLER tente sans succès, en 1915, l'immunisation de l'homme au moyen de toxine tétanique traitée par l'aldéhyde formique. Son échec s'explique aisément si l'on considère que l'on ne pouvait alors ni évaluer exactement le pouvoir antigène des toxines, ni apprécier, fût-ce grossièrement, la dégradation subie par ce pouvoir antigène du fait de l'action des agents employés pour détruire la toxicité des toxines. Cette dégradation, dans ce cas particulier, devait être considérable puisque l'immunisation du cobaye nécessitait l'injection de 1 à 5 c. c. du vaccin de von EISLER, doses très importantes eu égard au poids de l'animal considéré. Il s'agissait, dans ce cas, d'un antigène peu actif.

En 1921, BUXTON vaccine par des mélanges de

toxine et d'antitoxine des chevaux qui résistent, par la suite, à une inoculation virulente. Nous pensons cependant que cette méthode, largement employée, et avec succès, pour la préparation des chevaux producteurs de sérum, présente des inconvénients dans le cas particulier que nous envisageons : le dosage des constituants de ces mélanges est toujours délicat et c'est pour cette raison, sans doute, que les résultats obtenus par ce procédé sont incertains et inégaux.

Tel était l'état de la question lorsque notre collègue RAMON, alors au début de ses recherches sur l'anatoxine diphtérique, nous incita à étudier l'anatoxine tétanique. Déjà en 1924, au début de nos recherches sur ce sujet, nous mettions en relief le pouvoir antigène considérable de l'anatoxine tétanique et nous préconisions son emploi pour l'immunisation systématique des animaux. Ayant, en 1925, définitivement mis au point la préparation de l'anatoxine, nous confirmions nos premiers résultats et nous précisions certains points relatifs à l'immunisation active du cheval. Par la suite, RAMON et ZOELLER devaient, en 1925 et 1926, montrer que l'anatoxine permet de réaliser l'immunisation active de l'homme et préciser les conditions de cette immunisation.

Tels sont, à notre connaissance, les essais de vaccination antitétanique qui ont été effectués jusqu'à ce jour.

IV

L'ANATOXINE TÉTANIQUE

a) DÉFINITION

Nous ne saurions mieux faire, pour définir l'anatoxine tétanique, que d'appliquer à son cas particulier la définition générale des anatoxines telle que l'a donnée RAMON. Nous dirons donc que *l'anatoxine tétanique est un produit qui a perdu toute la nocivité de la toxine tétanique dont il dérive, mais qui en possède encore la valeur floculante et en a conservé également toutes les propriétés immunisantes.*

Cette définition montre que la notion générale d'anatoxine repose, avant tout, sur l'existence de la réaction de floculation. Nous croyons donc nécessaire, pour la compréhension de notre exposé, d'étudier, très sommairement, le phénomène de floculation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine tétaniques.

b) LA FLOCCULATION DANS LES MÉLANGES DE TOXINE ET D'ANTITOXINE TÉTANIQUES

Considérons une toxine tétanique, fraîchement préparée, tuant, en quatre jours, le cobaye de 300 grammes à la dose de 0,0001 c. c. Répartissons-la dans des tubes

à essais à raison de 20 c. c. de toxine par tube. Dans chacun de ces tubes ajoutons du sérum antitétanique frais, soit un serum titrant 5000 unités antitoxiques, (notation française), en augmentant progressivement les doses : 0,15 c. c. dans le premier, 0,20 c. c. dans le second, 0,25 c. c. dans le troisième, et dans les suivants, respectivement, 0,30 c. c. 0,35 c. c.etc. Nos tubes étant bouchés, assurons le mélange de leur contenu puis portons-les au bain-marie à la température de 45°.

Nous constatons, par la suite, au sein de la plupart de ces mélanges, l'apparition d'une opalescence dont l'intensité s'accroît progressivement. Bientôt, dans l'un des mélanges les plus opalescents, celui qui renferme par exemple 0,25 c. c. de sérum, il devient possible de distinguer la formation de fines particules dont le volume s'accroît peu à peu jusqu'à la constitution de flocons. Ceux-ci sédimentent et constituent au fond du tube un culot. Le même phénomène, identique dans ses phases successives, se produit, avec un retard plus ou moins considérable, dans d'autres tubes en commençant par les deux voisins immédiats du premier et en se propageant plus ou moins loin de part et d'autre de celui-ci.

Le phénomène, dans son aspect, rappelle, on le voit, très exactement, celui que RAMON a décrit dans les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques. Il en diffère par l'abondance plus faible du précipité et par la lenteur qu'il met à apparaître et qui rend presque indispensable d'opérer à l'étuve ou mieux au bain-marie.

Nous retiendrons comme « flocculation » la *floculation initiale*, c'est-à-dire celle qui s'est manifestée par l'apparition des tous premiers flocons. Nous dirons, dans le cas particulier que nous venons d'envisager, que la toxine et le serum employés flocculent à raison de 20 de toxine pour 0,25 de sérum.

Cette réaction est spécifique. Elle ne se produit au sein de la toxine tétanique que si on lui ajoute en quantité convenable du sérum antitétanique. D'autres sérums, thérapeutiques ou normaux, de provenances diverses, ne peuvent en aucun cas la provoquer. Inversement, le serum antitétanique ne peut la déterminer ni avec le bouillon qui sert aux cultures du bacille tétanique, ni avec diverses toxines telles que les toxines diphtérique ou dysentérique.

Tel que nous venons de le décrire, le phénomène de floculation comporte deux éléments d'appréciation : le temps nécessaire à la manifestation de la réaction, que nous appellerons *temps de floculation*, et les proportions respectives des deux constituants du mélange floculant, que nous désignerons sous la dénomination de *taux de floculation*.

1^o) Le temps de floculation. — La rapidité avec laquelle se manifeste la réaction est très variable et dépend de divers facteurs dont nous allons envisager l'action en quelques mots.

La réaction se produit d'autant plus vite qu'elle s'effectue à une température plus élevée. Un même mélange qui flocule en deux heures, à la température de 45 à 50°, flocule en 15 heures à la température du laboratoire (18°) et ne flocule pas aux environs de 0°.

La floculation, nous l'avons dit, est plus lente à apparaître dans les mélanges toxine-antitoxine tétaniques que dans les mélanges toxine-antitoxine diphtériques. *Il est donc à peu près indispensable d'opérer à l'étuve ou mieux au bain-marie.* Il ne faut pas tenir compte des résultats obtenus à une température supérieure à 60°. A une telle température, la toxine présente spontanément des précipités qui rendent impossible l'interprétation de la floculation.

La vitesse de la réaction dépend aussi de l'état de concentration de la toxine. En opérant dans les mêmes conditions de température et avec le même sérum, *une toxine floccule d'autant plus lentement qu'on la dilue davantage*. C'est pour cette raison, sans doute, que les toxines fortes flocculent toujours plus vite que les toxines faibles.

Signalons enfin que, si la qualité de la toxine a son importance, la qualité du sérum influe aussi sur la rapidité de la réaction. Pour des raisons indéterminées, deux sérums faisant flocculer une même toxine au même taux demandent des temps différents pour manifester leur action.

2°) Taux de flocculation. Toxicité. Pouvoir antigène. Le taux de flocculation constitue l'élément essentiel d'appréciation de la réaction de flocculation. Il dépend, à la fois, des qualités de la toxine et des qualités du sérum. C'est sur le taux de flocculation que reposent les méthodes de titrage des antigènes et des anticorps auxquelles est attaché le nom de RAMON. Nous n'envisagerons ici que le titrage de la toxine tétanique.

Pour rendre toutes nos expériences comparables entre elles, et en vue d'éliminer toutes causes de variations inhérentes au sérum, toutes nos réactions, aussi bien pour les anatoxines que pour les toxines, seront effectuées avec le même sérum. Ce sérum spécialement choisi (1), est conservé à l'état sec ; il titre, lorsqu'il

(1) Dans une note dont la publication fut postérieure à la rédaction de ce travail, nous nous sommes expliqués avec RAMON, sur les raisons de ce choix. Le sérum que nous utilisons depuis plusieurs années est fourni par le même cheval. Sa valeur flocculante à chaque saignée mensuelle est en rapport étroit avec sa valeur antitoxique. Les mélanges où il détermine la flocculation « initiale » sont toujours neutres, qualité essentielle puisque le

est dissout dans 9 fois son poids d'eau, 5000 unités antitoxiques au centimètre-cube. Lorsque nous dirons que l'indice de floculation d'une toxine ou d'une anatoxine est de : 0,15, 0,30, 0,65, nous entendrons par là que la toxine ou l'anatoxine considérée flocule, *avec ce serum étalon*, à raison de 0,15, 0,30, 0,65 de sérum pour 20 de toxine ou d'anatoxine.

Depuis que la préparation des sérums est devenue une industrie, on s'est toujours efforcé de produire des sérums de plus en plus antitoxiques. Pour y parvenir, on a cherché à obtenir des toxines de plus en plus actives en s'appuyant sur cette notion couramment admise que le pouvoir antigène d'une toxine est d'autant plus considérable que sa toxicité est plus grande ou, corollairement, que la toxicité est l'unique raison du pouvoir antigène. C'est pourquoi, jusqu'à ces dernières années, on ne titrait jamais les toxines qu'en fonction de leur nocivité pour l'animal. La pratique de l'immunisation montre bien, en effet, que l'emploi de toxines fortes permet d'obtenir des sérums plus actifs que l'emploi de toxines faibles. Cependant *la notion de l'équivalence de la toxicité et du pouvoir antigène est inexacte* et les travaux de RAMON devaient venir projeter sur cette question des clartés nouvelles.

RAMON a étudié systématiquement dans des cultures de bacille diphtérique, la toxicité, le pouvoir antigène et le pouvoir floculant. Il a montré que, tant que la toxicité s'accroît, le pouvoir antigène et le pouvoir floculant s'accroissent dans des proportions exactement équivalen-

principe de la méthode de titrage par la floculation repose sur la neutralité du mélange floculant.

Dans la même note nous avons montré comment on peut chiffrer la valeur antigène d'une toxine (unités antigéniques) ou d'une anatoxine (unités anatoxiques) suivant le principe défini et adopté par Ramon pour la toxine et pour l'anatoxine diphtériques.

tes. Il s'ensuit que, pendant cette période d'accroissement de la toxicité, la connaissance de la valeur de l'un de ces trois éléments considérés permet de déterminer avec exactitude la valeur des deux autres. C'est dans ces conditions seulement que le pouvoir flocculant peut servir à évaluer à la fois le pouvoir antigène et la toxicité. Bientôt, en effet, la toxicité cesse de croître puis diminue alors que le pouvoir antigène et le pouvoir flocculant restent stables. A ce moment, la flocculation permet d'apprécier le pouvoir antigène mais non plus la toxicité de la culture. Elle ne peut fournir d'indications que sur le maximum de toxicité par lequel a passé la culture et dont elle reste, en quelque sorte, le témoin; elle continue, par contre, répétons-le, à traduire très fidèlement la valeur du pouvoir antigène.

Si, donc, il y a entre toxicité et pouvoir antigène un indéniable rapport d'équivalence à l'origine, ces deux éléments cessent bientôt d'être superposables. *La toxicité ne saurait donc être la raison du pouvoir antigène d'une toxine.*

Nous avons cherché à déterminer les rapports qui existent entre la toxicité, le pouvoir antigène et le pouvoir flocculant de la toxine tétanique. Nous sommes arrivé à des conclusions identiques à celles de RAMON pour la toxine diphtérique. N'ayant pu opérer, comme lui, en suivant des cultures depuis l'ensemencement du milieu jusqu'à la filtration, nous avons dû nous contenter d'expérimenter uniquement sur des toxines, mises d'ailleurs à notre disposition en abondance. Ces toxines, bien que nous les ayons examinées peu après leur filtration, avaient toujours perdu de leur toxicité, en raison de la fragilité bien connue du poison tétanique. C'est pourquoi nous n'avons jamais trouvé une concordance absolue entre la toxicité et les indications fournies par la flocculation. Nous avons constaté, cependant,

que ces toxines, fraîchement préparées et filtrées au moment où elles atteignent le maximum de leur toxicité, avaient un indice de floculation d'autant plus élevé que leur toxicité était plus grande, ainsi que le fait ressortir, par exemple, l'examen de trois échantillons de toxine dont les caractères sont les suivants :

1 ^o	Toxine tuant le cobaye au 1/3000 ^e de c.c.,	indice de floculation	0.15
2 ^o	—	1/8000 ^e	—
3 ^o	—	1/25000 ^e	—
			0.30
			0.80

Les rapports entre la toxicité et le pouvoir antigène, pour n'être pas mathématiques, n'en sont pas moins évidents. La discordance tient, répétons-le, à ce fait que la toxicité est un élément essentiellement variable, alors que le pouvoir floculant est essentiellement fixe.

Le pouvoir antigène est difficile à évaluer sur l'animal, mais des expériences répétées, effectuées comparativement *in vitro* et *in vivo*, montrent que *les variations du pouvoir antigène correspondent à des variations équivalentes du pouvoir floculant*. L'observation pendant plusieurs années d'un effectif de plusieurs centaines de chevaux à sérum nous a montré que l'emploi de toxines à faible indice de floculation ne permet d'obtenir que des serums médiocres. L'activité de ceux-ci se relève cependant dès qu'on emploie des toxines à indice de floculation plus élevé, toxines qui sont d'ailleurs, mais dans une certaine mesure seulement, plus toxiques que les premières.

Ainsi se vérifie, pour la toxine tétanique, l'étroitesse des rapports qui existent entre le pouvoir antigène et le pouvoir floculant.

c) PRÉPARATION DE L'ANATOXINE

Considérons une toxine tétanique qui, en injection intra-musculaire, tue, en quatre ou cinq jours, le cobaye de 300 grammes à la dose de 0,0001 c. c. Mélangée à notre sérum étalon, cette toxine floccule au taux de 20 de toxine pour 0,35 de sérum. Ajoutons lui 2 c. c. pour 1000 d'une solution à 40 % d'aldéhyde formique. Plaçons le mélange à l'étuve, à la température de 37-38°.

Si, dans la suite, nous effectuons des prélèvements successifs, nous constatons, par l'injection au cobaye, que la toxicité du mélange s'abaisse progressivement. Cet abaissement de la toxicité est particulièrement rapide et manifeste dans les tous premiers jours. C'est ainsi qu'après quarante-huit heures de séjour à l'étuve, la toxine formolée ne donne même plus de tétanos local au cobaye à la dose de 0,0005 c. c., la dose minima mortelle n'étant plus alors que de 0,01 c. c. Après cinq ou six jours, l'injection au cobaye de la dose énorme de 5 c. c. est incapable de provoquer le moindre accident local de tétanos. A ce moment cependant la toxicité est encore loin d'être totalement abolie et si l'injection de 5 c. c. ne provoque pas de contractures locales, elle est suivie, néanmoins, après quatre jours environ, d'un tétanos généralisé mortel. Ce pouvoir de déterminer du tétanos généralisé d'emblée ne disparaît qu'à la longue et on constate que les accidents de cet ordre sont à échéance d'autant plus éloignée que la toxine a séjourné davantage à l'étuve. Ils peuvent apparaître cinq, dix, douze jours après l'injection (1).

(1) Ces accidents sont à rapprocher de ceux que l'on observe lors de l'injection de mélanges de toxine et d'antitoxine incomplètement neutralisés, ou lors d'injections de toxine tétanique affaiblie par la chaleur. Ils rappellent également ceux qu'ont provoqués NICOLLE et POZERSKI en injectant des fractions de dose mortelle de toxine.

C'est seulement lorsque l'injection sous-cutanée de 10 c. c. est devenue tout à fait inoffensive pour le cobaye, lorsqu'elle ne provoque plus chez lui aucun accident précoce ou tardif d'intoxication au cours d'une observation de plusieurs semaines, que la toxine est transformée en anatoxine. Ce résultat, pour la toxine envisagée et traitée comme nous l'avons dit, est obtenu en 20 jours environ.

Si nous examinons le pouvoir flocculant de la toxine formolée au cours de son séjour à l'étuve et jusqu'à sa transformation en anatoxine, nous constatons, en utilisant toujours le même serum, que *le taux de flocculation reste invariable, il constitue une véritable constante du phénomène*. Par contre, le temps de flocculation est d'autant plus long que la toxine, ou l'anatoxine, a séjourné davantage à l'étuve. Si, par exemple, la toxine originelle floccule en deux heures trente minutes à la température de 45°, la toxine formolée à 2 pour mille flocculera, avec le même sérum, en cinq heures après deux jours d'étuve, en sept heures après six jours, en neuf heures après dix jours, en quatorze heures après vingt jours, la réaction s'effectuant toujours à la même température de 45°.

Si le temps de flocculation d'une anatoxine dépend, comme nous venons de le voir de la durée de son séjour à l'étuve, il dépend en outre de la quantité de formol employée pour sa préparation. Au lieu de 2 c. c., ajoutons à la toxine, toujours la même, 5 c. c. pour mille de formol. Nous voyons que le temps de flocculation est de sept heures trente minutes après deux jours d'étuve seulement, il atteint dix-huit heures après six jours et s'allonge tellement par la suite, que toute interprétation sinon toute observation du phénomène de flocculation devient impossible. L'abaissement de la toxicité est plus rapide, il est vrai, mais l'anatoxine obtenue floccule, malgré tout en un temps très long. Or RAMON a mon-

tré que la lenteur excessive de la réaction de floculation caractérise les antigènes de qualité inférieure. Nous montrerons que cette donnée, d'une portée générale, s'applique parfaitement à l'anatoxine tétanique. Des doses de formol telles que 1 c. c. ou 0,5 c. c. pour mille n'ont sur la toxicité qu'une influence médiocre et donnent de mauvais résultats, car il faut, si l'on a recours à de telles quantités de formol, prolonger l'action de la température de l'étuve. Leur emploi n'est pas à conseiller.

Il faut donc, dans la préparation de l'anatoxine tétanique comme dans celle de toutes les anatoxines, employer des quantités de formol assez considérables pour détruire le plus rapidement possible la toxicité, assez faibles cependant pour altérer au minimum le pouvoir antigène de la toxine employée, l'intégrité de ce pouvoir antigène étant susceptible, comme nous allons le voir, d'être contrôlée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. A titre d'indication, signalons que, pour des toxines dont la toxicité fut comprise entre 1/3000 et 1/25000 et dont l'indice de floculation allait de 0,15 à 0,80, nous avons obtenu de bons résultats avec des doses de formol variant de 1,5 à 3 c. c. pour mille et en faisant agir la température de l'étuve pendant un temps compris entre quinze et vingt-cinq jours.

Il est indispensable, si l'on veut obtenir des résultats satisfaisants et réguliers, d'employer, pour la préparation des anatoxines, *des toxines fraîchement préparées et n'ayant subi aucun traitement préalable* tel que chauffage ou addition d'antiseptiques ou de colorants.

Ajoutons que nos essais nous ont montré que le temps de floculation d'une bonne anatoxine ne doit pas, autant que possible excéder le double du temps de floculation de la toxine originelle. Il est parfois difficile cependant de ne pas dépasser cette limite, mais il est presque indis-

pensable de l'atteindre si l'on veut obtenir des produits sans toxicité, ainsi que le montre l'exemple suivant :

Une toxine, flocculant en 1 h. 15 au taux de 0,30 de sérum pour 20 de toxine, est répartie dans quatre flacons, dans chacun desquels on ajoute une certaine quantité de formol, soit :

Flacon n° 1 :	1	c. c. pour mille de formol.
—	2 :	1,5
—	3 :	2
—	4 :	3

Ces quatre flacons placés à l'étuve à 37-38° en sont retirés au bout de dix-sept jours. A ce moment, l'examen par la floculation de leur contenu montre que, l'indice de floculation restant le même, le temps de floculation est de 1 h. 30' pour le premier flacon, 2 h. 15' pour le deuxième, 2 h. 40' pour le troisième et 6 h. pour le quatrième. L'injection au cobaye de 5 c. c. de chacun de ces produits montre que le contenu du premier flacon est encore toxique et tue le cobaye en cinq jours, celui des flacons 2, 3, et 4 est toléré sans accident. Parmi ces quatre flacons, les trois derniers seulement peuvent être utilisés, le premier ne peut être considéré comme transformé en anatoxine.

Notons, enfin, que l'aldéhyde formique, si elle convient particulièrement pour transformer la toxine tétanique en anatoxine, n'est pas la seule substance qui jouisse de cette propriété. RAMON et BERTHELOT qui ont étudié l'action sur les toxines tétanique et diphtérique d'un très grand nombre de substances, et en particulier de diverses aldéhydes, ont reconnu que nombre d'entre celles-ci exercent sur les toxines une action comparable à celle du formol. Selon ces deux auteurs l'aldéhyde éthylique notamment, dont l'action est plus douce que celle du formol, conviendrait particulièrement pour transformer la toxine tétanique dont le pouvoir

antigène est plus fragile que celui de la toxine diphtérique. Nous n'avons jamais utilisé, pour notre part, d'autre produit que le formol.

d) INNOCUITÉ

L'anatoxine tétanique doit être, par définition, un produit d'une innocuité absolue. Nous avons dit que le cobaye en supporte sans dommage de fortes doses, telles que 10 c. c., par exemple. Mais on peut, à la vérité, lui en injecter impunément bien plus encore. C'est régulièrement, lors du contrôle des anatoxines, que nous en injectons 20 c. c. à des cobayes de 400 grammes, soit 1/20 de leur poids. Le cheval peut lui aussi en supporter des quantités considérables. La dose la plus forte que nous ayons injectée d'emblée à un sujet neuf de cette espèce est de 800 c. c. Il est vraisemblable qu'elle aurait pu, sans inconvénients, être plusieurs fois dépassée.

L'anatoxine tétanique est donc inoffensive pour des sujets normaux.

On pourrait redouter, toutefois, qu'elle se montre capable de réveiller l'activité de spores tétaniques à l'état latent dans l'organisme. Nous avons pu nous convaincre que cette éventualité n'est pas à redouter, ainsi que le montre l'expérience suivante :

Une série de huit cobayes est fractionnée en quatre lots de deux cobayes chacun. Les cobayes du premier lot reçoivent chacun 0,01 c. c. d'une culture en bouillon de bacille tétanique âgée de quinze jours. Ceux du deuxième, une dose égale de la même culture chauffée à 80° pendant une heure et demie. Ceux du troisième, une même dose de culture chauffée, additionnée de 0,2 c. c. d'anatoxine. Ceux du quatrième, 0,01 c. c. de

culture chauffée, additionnée de 0,05 gr. de chlorhydrate de quinine stérilisé. De ces cobayes, seuls ceux des premier et quatrième lots présentent du tétanos et en meurent, ceux du premier après quarante-huit heures, ceux du quatrième après cinq jours seulement.

L'emploi de l'anatoxine n'a donc aucune influence sur les spores tétaniques dont l'organisme peut être porteur.

Dans un autre ordre d'idées, signalons que des injections intracérébrales répétées d'anatoxine n'ont jamais provoqué chez le cobaye *aucun accident d'anaphylaxie.*

e) POUVOIR ANTIGÈNE

Nous avons vu que l'anatoxine tétanique est un produit dépourvu de toute espèce de toxicité, qu'elle possède la même activité floculante que la toxine dont elle dérive. Il nous reste à examiner, maintenant, quelles sont ses qualités immunisantes. L'étude détaillée de l'immunisation des animaux devrait entrer tout naturellement dans ce paragraphe; mais étant donnés les développements que comporte l'exposé de cette question, nous lui consacrerons deux chapitres dans lesquels nous traiterons successivement de l'immunisation du cobaye et de celle du cheval. Nous nous bornerons, pour le moment, à mettre simplement en évidence l'existence du pouvoir antigène de l'anatoxine tétanique et à étudier les rapports de ce pouvoir antigène avec la réaction de floculation. La comparaison qui s'impose entre le pouvoir antigène de l'anatoxine et celui de divers autres vaccins sera faite à propos de la vaccination du cobaye.

Considérons une anatoxine comparable à l'anatoxine type dont nous avons suivi la préparation. Injectons en 1 c. c. sous la peau à un certain nombre de cobayes. Nous pourrions constater, au bout d'un mois, que la

plupart de ces cobayes survivent à l'injection intramusculaire de 1000 doses mortelles de toxine. Des doses bien moindres d'anatoxine suffisent à développer, chez le cobaye, une résistance encore très notable. Des cobayes qui reçoivent en injection sous-cutanée 0,1 c. c. d'anatoxine acquièrent une immunité qui leur permet, 60 jours après la vaccination, de résister, sans tétanos local, à l'injection d'épreuve de 10 doses mortelles de toxine. L'injection à de tels sujets de 20 doses mortelles est suivie de tétanos local mais n'entraîne pas la mort.

L'anatoxine tétanique constitue donc un bon antigène. Pour s'en convaincre il suffit de considérer les difficultés que l'on éprouve habituellement à immuniser le cobaye contre le tétanos.

Pouvoir flocculant et Pouvoir antigène. Il est facile de montrer que la valeur antigène d'une anatoxine est étroitement liée à la valeur de son pouvoir flocculant. Nous allons voir, en effet, qu'il suffit de faire varier ou de supprimer l'un pour faire varier parallèlement ou supprimer l'autre.

1). PAS DE POUVOIR ANTIGÈNE SANS POUVOIR FLOCCULANT. Considérons une toxine tétanique dont l'indice de flocculation est, par exemple de 0,50. Répartissons-la dans deux flacons, puis ajoutons, dans l'un de ces flacons, 2 c. c. pour mille de formol, dans l'autre, 6 c. c. pour mille. Plaçons les à l'étuve, à la température de 37°, et retirons-les tous les deux au bout d'un mois. A ce moment, la toxine est devenue parfaitement inoffensive pour le cobaye dans les deux cas. Prenons alors un certain nombre de cobayes que nous partageons en deux lots égaux. Injectons sous la peau, à chacun des cobayes du premier lot, 0,1 c. c. d'anatoxine obtenue par 2 c. c. pour mille de formol, à ceux du deuxième, une dose égale de l'autre anatoxine. Au bout d'un mois,

si nous éprouvons tous ces cobayes, en leur injectant des quantités de toxine allant de 1 à 100 doses mortelles et en opérant dans des conditions identiques pour chaque lot, nous constatons que les cobayes du deuxième lot n'ont aucune espèce d'immunité et meurent tous dans les mêmes délais que les témoins, tandis qu'on ne peut faire succomber ceux du premier qu'en leur injectant 50 doses mortelles de toxine.

Si, d'autre part, nous examinons ces deux anatoxines au point de vue de leur valeur flocculante, nous constatons que celle qui a servi à préparer les cobayes du premier lot et qui est restée antigène, a conservé ses propriétés et que son indice de flocculation est toujours le même; l'autre, au contraire, qui n'a plus aucune valeur antigène, est incapable de flocculer, à quelque taux et dans quelque délai que se soit. Ce n'est plus une anatoxine. Nous verrons, de même, qu'une anatoxine qui a perdu sous l'influence du chauffage à haute température son pouvoir antigène n'a plus aucune propriété flocculante.

Ainsi, la destruction du pouvoir antigène va de pair avec la disparition du pouvoir flocculant. *Il n'est donc pas de pouvoir antigène sans pouvoir flocculant.*

Nous allons montrer, maintenant, qu'on peut mesurer le pouvoir antigène d'une anatoxine en fonction du pouvoir flocculant. Il nous faudra envisager ici successivement le temps et le taux de flocculation.

2). INFLUENCE DU TAUX DE FLOCCULATION. Prenons deux toxines tétaniques, ayant, l'une un indice de flocculation de 0,35, l'autre un indice de 0,70. Transformons-les en anatoxines en les additionnant de 2 c. c. pour mille de formol et en les laissant séjourner pendant 20 jours à l'étuve. Assurons-nous, ce laps de temps écoulé, et de leur innocuité pour le cobaye, et de la persistance de leur valeur flocculante. Ceci fait, prépa-

rons deux lots de cobayes et injectons, à chacun de ceux du premier, 0,1 c. c. de l'anatoxine dont l'indice de floculation est de 0,35, à chacun de ceux du deuxième 0,1 c. c. de l'autre. Au bout de 45 jours si nous éprouvons tous ces cobayes en leur injectant des quantités de toxine allant de 2 à 100 doses mortelles, et en opérant dans des conditions strictement identiques pour chaque lot, nous voyons que, dans le premier lot le tétanos local ne fait jamais défaut à partir de 10 doses mortelles, la mortalité par tétanos atteint 30 % pour des doses d'épreuve allant de 2 à 10 doses mortelles inclusivement, elle atteint 65 % à partir de 20 doses mortelles. Dans le deuxième lot, il faut atteindre 50 doses mortelles pour déterminer à coup sûr du tétanos local, la mortalité est nulle de 2 à 20 doses mortelles, elle est de 30 % seulement à partir de 20 doses mortelles. Si on examine dans leur ensemble ces résultats, on constate que, dans le premier lot la morbidité par tétanos est de 90 %, la mortalité étant de 50 % de l'effectif total ; dans le deuxième lot la morbidité est de 65 %, la mortalité n'atteignant que 25 % seulement.

Cette expérience nous montre la concordance qui existe entre le taux de floculation et la valeur du pouvoir antigène des anatoxines. Nous avons eu l'occasion d'observer, d'autre part, au cours de l'immunisation de très nombreux chevaux, des résultats analogues.

Il résulte donc de ces faits *que le pouvoir floculant d'une anatoxine est d'autant plus élevé que son pouvoir antigène est plus considérable et inversement.*

3). INFLUENCE DU TEMPS DE FLOCCULATION. Toutes les anatoxines, même lorsqu'elles procèdent d'une même toxine originelle, ne possèdent pas un égal pouvoir antigène. Nous avons vu qu'en partant d'une même toxine, on peut, suivant le mode de préparation mis en œuvre,

obtenir des anatoxines qui, tout en ayant le même indice de floculation, flocculent à des taux différents à la même température. RAMON montre que, d'une façon générale, pour toutes les anatoxines, le pouvoir antigène est d'autant plus considérable que le temps de floculation est plus réduit. L'anatoxine tétanique n'échappe point à cette règle.

Considérons deux anatoxines de même origine, ayant le même indice de floculation, mais flocculant, l'une en 4 heures, l'autre en 7 heures, à la température de 55°. Injectons 0,5 c.c. de la première à chacun des cobayes d'un premier lot, 0,5 c.c. de la deuxième à chacun des cobayes d'un deuxième lot. Au bout d'un mois éprouvons tous ces cobayes avec des quantités de toxine tétanique variant de 1 à 500 doses mortelles. Des doses correspondantes de la même toxine amènent la mort des témoins en des temps compris entre 24 heures et 5 jours. Dans le premier lot, les cobayes éprouvés par l'injection de 1 à 5 doses mortelles ne présentent aucun accident; de 5 à 50 doses mortelles, le tétanos local s'observe chez 50 % des sujets éprouvés; de 100 à 500 doses mortelles, le tétanos local apparaît régulièrement chez tous les cobayes mais n'est pas suivi de mort. Par opposition, dans le deuxième lot de vaccinés, nous enregistrons 50 % de cas de tétanos local avec 1 dose mortelle seulement, 100 % à partir de 2 doses mortelles, la mort survient, irrégulièrement d'ailleurs, quand on atteint 200 doses mortelles.

Le temps de floculation peut donc servir à apprécier le pouvoir antigène des anatoxines. Il va sans dire que le taux de floculation reste l'élément fondamental de cette appréciation.

f) STABILITÉ

L'anatoxine tétanique est un antigène stable. Elle peut être manipulée sans grands dangers de contamination, car le formol qu'elle renferme fait obstacle aux cultures que pourraient rendre possibles les souillures accidentelles. *Le vieillissement et la lumière diffuse n'ont sur elle qu'une action insignifiante.* Nous utilisons couramment des anatoxines préparées depuis plusieurs mois et conservées au laboratoire ; elles nous donnent d'aussi bons résultats que des anatoxines fraîchement préparées ou que des anatoxines de même âge conservées à la glacière.

L'anatoxine témoigne enfin d'une assez grande résistance à la chaleur.

Résistance à la chaleur. Une anatoxine tétanique, floculant en 8 heures à la température de 45° et dont l'indice de floculation est de 0,70, est répartie dans cinq flacons dont l'un est conservé tel quel, sans chauffage. Les quatre autres sont chauffés pendant une heure et demie au bain-marie, l'un à 55°, un deuxième à 60°, le troisième à 65° et le dernier à 70°. Ceci fait, prenons cinq lots de douze cobayes chacun et injectons, sous la peau, à chacun de ces cobayes, une dose uniforme de 0,1 c.c. d'anatoxine, non chauffée pour ceux du premier lot, chauffée à 55° pour ceux du deuxième, à 60° pour ceux du troisième, à 65° pour ceux du quatrième et à 70° pour ceux du cinquième lot.

Au bout d'un mois, éprouvons tous ces cobayes en leur injectant 2, 5, 10, 20, 50 et 100 doses mortelles de toxine tétanique, à raison de deux cobayes dans chaque lot pour chacune de ces quantités de toxine. Faisons un nombre égal de témoins pour contrôler l'activité de la toxine employée. Nous constatons les jours

suivants : que les cobayes témoins meurent, suivant la quantité de toxine reçue, en des temps compris entre 12 et 72 heures ; que parmi les cobayes des deux premiers lots, la mort survient régulièrement à partir de 100 doses mortelles, à partir de 50 doses mortelles pour ceux du troisième, de 20 doses mortelles pour ceux du quatrième, de 2 doses mortelles pour ceux du cinquième. Dans l'ensemble, la mortalité atteint 35 % dans les deux premiers lots, 50 % dans le troisième, 75 % dans le quatrième et 100 % dans le cinquième, exactement comme chez les témoins.

En réalité, le chauffage de 70° n'abolit pas tout le pouvoir antigène de l'anatoxine. On constate en effet que l'injection de fortes doses d'anatoxine chauffée à 70° confère encore au cobaye une résistance, faible sans doute, mais appréciable cependant :

12 cobayes sont préparés de la façon suivante : 4 d'entre eux reçoivent 1 c. c. d'anatoxine, 4 autres 1 c. c. de la même anatoxine chauffée à 70° pendant une heure et demie et les quatre derniers cobayes 1 c. c. de la même anatoxine chauffée à 80° pendant le même temps. Au bout d'un mois, éprouvons ces douze cobayes de la façon suivante : dans chaque lot, un cobaye reçoit 1 dose mortelle, un deuxième 10 doses mortelles, un troisième 100 doses mortelles et le quatrième 500 doses mortelles de toxine. Les témoins meurent dans les délais habituels : 4 jours pour une dose mortelle, 2 jours pour 10 doses mortelles, 12 à 24 heures pour 500 et 100 doses mortelles. Tous les cobayes du troisième lot (anatoxine chauffée à 80°) meurent dans les mêmes délais que les témoins ; parmi ceux du deuxième (anatoxine chauffée à 70°), seul survit celui qui reçoit 1 dose mortelle, tous les autres succombent à peu près en même temps que les témoins ; tous les cobayes du premier lot survivent.

In vitro, une étude parallèle, par la floculation, de la résistance du pouvoir antigène à la chaleur confirme pleinement ces résultats.

En opérant toujours avec le même sérum et à la même température nous voyons qu'une anatoxine qui, non chauffée, flocule en 8 heures au taux de 0,70, flocule au même taux et dans le même temps après chauffage à 55°, au même taux mais en 9 heures après chauffage à 60°, toujours au même taux mais en 20 à 24 heures après chauffage à 65°. Elle ne flocule plus après chauffage à 70°. Ajoutons qu'aux environs de 70° et au-dessus un précipité spontané apparaît au sein de l'anatoxine. Ce précipité, d'autant plus abondant que la température qui le provoque est plus élevée, en même temps qu'il élimine toute possibilité de floculation, rend matériellement et immédiatement appréciable l'altération de l'anatoxine.

Ainsi, l'expérimentation, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, montre que *le pouvoir antigène de l'anatoxine tétanique, qui est inaltéré par le chauffage à 55°, fléchit légèrement à 60°, s'altère considérablement à 65° pour disparaître presque entièrement à 70°. A 80° sa destruction est complète.*

Au point de vue pratique, quoique plus fragile dans ses propriétés antigènes que l'anatoxine diphtérique, *l'anatoxine tétanique peut subir, aussi bien que celle-ci, la tyndallisation, sans aucun danger pour ses propriétés immunisantes.* Les anatoxines que nous utilisons, soit pour l'immunisation, soit pour l'hyperimmunisation sont chauffées à 55°. Elles nous donnent toujours d'aussi bons résultats que les anatoxines non chauffées (1).

(1) C'est ce que montrent les faits suivants : 6 chevaux reçoivent, chacun, les doses suivantes d'anatoxine : 10, 20, 50, 75 et 100 c. c. (chaque injection est séparée de la suivante par un intervalle de 7 jours). Pour trois de ces

g) ANATOXINES ET TOXOÏDES

Certains auteurs persistent à ne voir dans les anatoxines autre chose que les *toxoides* d'EHRlich. Il existe cependant entre les deux une différence fondamentale. Le terme d'anatoxine correspond à un substratum matériel : une anatoxine est une substance, un produit de transformation d'une toxine et qui a conservé de celle-ci le pouvoir antigène et le pouvoir flocculant. *Une anatoxine est donc un antigène atoxique titrable in vitro.*

C'est sur ce principe absolument nouveau du titrage possible des antigènes par les anticorps, principe établi par RAMON, que repose entièrement la notion générale d'anatoxine. Les toxoïdes, toxones, toxines vraies d'EHRlich sont des vues de l'esprit. EHRlich, lui-même, n'accordait aux toxoïdes qu'un pouvoir antigène faible (1), leur qualité dominante étant, selon lui, l'affinité pour les antitoxines correspondantes.

Le terme de toxoïde, qui rappelle par trop une terminologie compliquée, créée de toutes pièces pour l'édification d'une théorie, doit donc être délibérément rejeté.

chevaux, l'anatoxine a subi un chauffage d'une heure à 55°. Sept jours après la dernière injection, les trois premiers chevaux (anatoxine chauffée) fournissent des sérums qui titrent respectivement : 300, 50 et 100 unités (notation française). Les sérums des trois autres chevaux (anatoxine non chauffée), prélevés dans les mêmes conditions, titrent 300, 50 et 50 unités.

(1) L. MARTIN, A. PREVOT et G. LOISEAU partagent cet avis. Cf. C. R. S. Biol. 1907, p. 1128.

IMMUNISATION DU COBAYE

Nos premières tentatives d'immunisation contre le tétanos par l'anatoxine tétanique, ont été faites sur le cobaye. Le cobaye est cependant, à cet égard, un mauvais animal d'expérience. Les différences individuelles que l'on observe chez des animaux en apparence tout à fait comparables, et d'ailleurs parfaitement sains, sont considérables. Le cobaye est, en outre, un animal fragile, très sensible à certaines influences qui accroissent dans de très grandes proportions sa sensibilité. C'est enfin un mauvais producteur d'antitoxine, si on le compare au cheval et au lapin. Nous ne pouvions, cependant, pour des raisons économiques, entreprendre l'étude de la vaccination antitétanique ni sur le lapin, ni, *a fortiori*, sur le cheval, et nous avons dû dégager à l'aide du cobaye certains principes généraux relatifs à l'immunisation antitétanique. Bien qu'il y ait, d'une espèce à une autre, des différences parfois très grandes, certains faits se vérifient, en effet, d'une façon assez générale et c'est pourquoi l'étude de l'immunisation du cobaye nous a facilité l'étude de l'immunisation du cheval.

Nous avons déjà signalé, à propos du pouvoir anti-

gène de l'anatoxine, qu'on peut vacciner le cobaye en lui injectant des doses d'anatoxine telles que 1 c.c. ou 0,1 c.c. Cette possibilité de l'immunisation du cobaye étant établie, nous allons examiner maintenant quels sont les divers facteurs qui règlent l'apparition et qui influent sur les qualités de l'immunité du cobaye.

a) INFLUENCE DE LA DOSE D'ANTIGÈNE .

Il est admis couramment que l'immunité d'un organisme est d'autant plus grande qu'il a reçu une quantité d'antigène plus considérable. Bien que cette notion n'ait, comme nous le verrons, qu'une valeur relative, on ne peut nier que, dans le cas particulier de l'immunisation du cobaye contre le tétanos, la dose d'antigène influe réellement sur la valeur de l'immunité conférée.

Notons, tout d'abord, qu'un *minimum d'antigène est indispensable pour faire apparaître l'immunité*. VAILLARD a déjà signalé que les animaux n'ont d'antitoxine titrable dans leurs humeurs qu'à la condition d'avoir reçu des doses assez considérables de toxine. Des doses d'anatoxine de l'ordre de 0,01 c.c. ne confèrent au cobaye aucune immunité appréciable, dans les conditions où nous avons opéré du moins. La dose la plus faible que nous utilisons couramment est de 0,1 c.c. L'expérience que nous allons relater montre dans quelle mesure la valeur de l'immunité dépend de la quantité d'antigène injectée.

Considérons trois lots de 20 cobayes chacun et injectons, sous la peau, à chacun de ceux du premier 0,1 c.c. d'anatoxine, à chacun de deux du deuxième 0,2 c.c. de la même anatoxine dont nous injectons 1 c.c. à chacun des cobayes du troisième lot. Au bout d'un mois, après avoir prélevé quelques centimètres cubes

dé sang à chacun de ces cobayes, si nous les éprouvons tous en leur injectant des doses variables de toxine, dont nous contrôlons comme toujours l'activité sur des témoins de poids égaux, nous constatons que les cobayes du premier lot ne peuvent survivre qu'à l'injection de quantités de toxine inférieures à 20 doses mortelles ; que ceux du deuxième survivent toujours à l'injection de 50 doses mortelles et souvent même de 100 doses mortelles ; quant à ceux du troisième ils résistent régulièrement à 1000 doses mortelles et parfois à l'injection de doses plus considérables de toxine.

La résistance du cobaye apparaît donc d'autant plus grande que la dose vaccinante a été plus forte.

La quantité d'antigène employée influe également sur la quantité d'antitoxine produite par les vaccinés. Pour s'en rendre compte, il suffit de rechercher et de doser l'antitoxine dans les sérums fournis par les sujets de l'expérience que nous venons de relater.

Les sérums provenant des cobayes des premier et troisième lots sont donc mélangés *in vitro* à des doses variables de toxine et les mélanges, ainsi effectués, sont injectés à des cobayes de 300 grammes, après trente minutes de contact. En opérant dans ces conditions, nous constatons que les sérums provenant des cobayes du premier lot neutralisent parfaitement 2 doses mortelles de toxine à la dose de 0,5 c.c., tandis que ceux qui proviennent des cobayes du deuxième lot neutralisent 100 doses mortelles à la dose de 0,1 c.c. Les cobayes qui reçoivent ces mélanges ne présentent même pas de tétanos local.

Ainsi, le cobaye produit d'autant plus d'antitoxine qu'il a reçu davantage d'anatoxine. Cela nous montre aussi, par surcroît, que *l'immunité d'un cobaye est d'autant plus considérable que ses humeurs sont plus riches en antitoxine* ou, en d'autres termes, que l'antitoxine

paraît bien être la raison de l'immunité du cobaye contre le tétanos. Nous aurons l'occasion de faire des constatations analogues à propos de l'immunité du cheval.

b) INFLUENCE DU TEMPS ÉCOULÉ DEPUIS LA VACCINATION

L'immunité, encore nulle chez le cobaye dix jours après une injection d'anatoxine, est très appréciable après deux semaines. Il s'en faut cependant qu'elle ait atteint son maximum à ce moment. Des cobayes vaccinés par l'injection sous-cutanée de 1 c. c. d'anatoxine, résistent, au bout de deux semaines, à l'injection de quelques doses mortelles de toxine. Loin de fléchir, comme on pourrait s'y attendre, cette résistance va encore s'accroître avec le temps : après trois semaines, les cobayes supportent de 50 à 100 doses mortelles de toxine, 500 ou 1000 après un mois, parfois plusieurs milliers de doses mortelles après deux ou trois mois. Ce phénomène inattendu s'observe d'une façon particulièrement nette chez les cobayes vaccinés par injection intra-cérébrale d'anatoxine. L'influence du temps semble, en outre, avoir pour effet de niveler, dans une certaine mesure, les différences individuelles toujours très accusées chez le cobaye.

Nous retiendrons de ces faits la lenteur avec laquelle l'immunité antitétanique atteint son maximum chez le cobaye. Nous pouvons dire, d'ores et déjà, que cette lenteur semble propre à l'immunité antitétanique en général. Nous y reviendrons à propos de l'immunisation du cheval.

c) INFLUENCE DE LA RÉPÉTITION DES INJECTIONS

Si une seule dose permet, chez le cobaye, d'obtenir une immunité solide, on obtient des résultats bien meilleurs au moyen d'injections répétées. Bien que ce fait soit très général nous ne croyons pas inutile cependant de l'envisager dans le cas particulier de l'immunisation antitétanique du cobaye.

Notons, tout d'abord, l'expérience nous l'a montré régulièrement, que pour retirer le maximum d'effets d'une deuxième injection d'anatoxine, *il faut ménager entre les deux injections un intervalle de temps assez long, pas moins de quinze jours et, si possible, trois semaines, un mois ou plus encore.*

Considérons trois lots de cobayes et injectons aux cobayes du premier lot 0,2 c. c. d'anatoxine, à ceux du deuxième deux doses de 0,1 c. c. chacune à trois semaines d'intervalle, à ceux du troisième deux doses de 1 c. c. d'anatoxine, toujours la même, en ménageant le même intervalle de trois semaines entre les deux interventions. Si nous éprouvons, en même temps, tous ces cobayes deux semaines après la deuxième injection pour ceux des deuxième et troisième lots, cinq semaines après l'unique injection pour ceux du premier, nous constatons : que les cobayes du premier lot peuvent résister à l'injection de 50 à 100 doses mortelles de toxine; que ceux du deuxième résistent à l'injection de 500 doses mortelles et ne succombent que pour 1000 doses mortelles; quand à ceux du troisième ils résistent à l'injection de 18000 doses mortelles, il faut atteindre 24000 doses mortelles pour les faire succomber.

Il suffit de considérer de tels chiffres pour se convaincre de la supériorité d'une vaccination comportant deux interventions sur celle qu'on réalise au moyen

d'une seule injection. Remarquons, en même temps, les résultats différents que l'on peut obtenir avec une même quantité d'anatoxine suivant que celle-ci est injectée en une seule fois ou qu'elle est fractionnée en deux doses égales injectées à quelques jours d'intervalle l'une de l'autre : alors que l'injection de 0,2 c. c. d'anatoxine permet au cobaye de supporter de 50 à 100 doses mortelles, deux injections de 0,1 c. c. lui permettent de résister à des quantités de toxine allant de 500 à 1000 doses mortelles. C'est le résultat qu'on atteindrait au moyen d'une injection unique de 1 c. c. d'anatoxine. C'est ce qui nous a fait dire que *si la quantité absolue d'anatoxine injectée a son importance, cette importance n'est que relative.*

d) INFLUENCE DE LA VOIE D'INTRODUCTION DE L'ANTIGÈNE

1°) Voies sous-cutanée, Intra-dermique, Intra-musculaire, Intra-vasculaire. Nous réalisons toujours l'immunisation, chez le cobaye, et chez le cheval, en injectant l'antigène sous la peau. Ce procédé, qui a pour lui l'avantage de la commodité, est aussi celui qui nous donne les meilleurs résultats. Mais l'organisme peut, il va sans dire, être sollicité par d'autres voies, avec un succès d'ailleurs très inégal suivant le procédé employé.

20 cobayes, répartis en quatre lots, reçoivent chacun 0,2 c. c. d'une même anatoxine, par voie sous-cutanée pour ceux du premier lot, par voie intra-dermique pour ceux du deuxième, par voie intra-musculaire pour ceux du troisième, par voie intra-veineuse (jugulaire) pour ceux du quatrième.

Au bout d'un mois les cobayes de chaque lot reçoivent l'un 2, un deuxième 10, un troisième 50, un quatrième 100, et le cinquième 200 doses mortelles de toxine tétanique. Cinq témoins reçoivent des doses équivalentes de toxine. Tous les témoins présentent du tétanos local douze heures après l'injection d'épreuve, ceux qui reçoivent 50, 100, et 200 doses mortelles meurent dans les 24 heures, celui qui reçoit 10 doses mortelles dans les 48 heures, celui qui reçoit 2 doses mortelles dans les 3 jours, qui suivent l'injection. Dans les deux premiers lots de vaccinés, les cobayes éprouvés par l'injection de 2, 10 et 50 doses mortelles survivent; ceux qui reçoivent 100 et 200 doses mortelles meurent de tétanos, avec retard il est vrai, par rapport aux témoins. Parmi les vaccinés du troisième lot, seuls survivent ceux qui reçoivent 2 et 10 doses mortelles, les trois autres meurent dans les mêmes délais que les témoins. Quant aux cobayes du quatrième lot, tous meurent de tétanos dans les mêmes délais que les témoins.

Ainsi, les meilleurs résultats sont fournis à la fois et de façon équivalente par les voies sous-cutanée et intradermique, la voie intra-musculaire vient ensuite, la voie intra-vasculaire venant en tout dernier lieu (1).

Si l'on considère que l'injection intra-vasculaire assure précisément une résorption immédiate et totale de l'antigène injecté, sans réaction locale possible, que l'injection sous-cutanée comporte une résorption lente, avec réaction locale plus ou moins perceptible mais dans tous les cas toujours possible; que l'injection intra-musculaire réalise un moyen terme entre ces deux extrêmes, on est frappé de la concordance qui existe entre la

(1) Ce qui ne veut pas dire que l'injection intra-vasculaire soit incapable de vacciner. En matière d'immunisation antitétanique, elle vaccine mal, quand elle vaccine, et, plus encore que lors d'injection sous-cutanée, l'immunité met dans ce cas longtemps à apparaître.

valeur de l'immunité d'une part, la lenteur de la résorption et la possibilité d'une réaction locale d'autre part. On semble fondé à conclure, dans ces conditions, que *l'immunité est d'autant plus solide que l'antigène est plus lentement résorbé, séjourne davantage au point même ou on le dépose*. L'étude de l'immunisation du cheval montrera le bien fondé de cette conception et les avantages considérables qu'elle a permis d'obtenir.

2°) Voie intra-cérébrale. Etant donnée l'affinité des cellules nerveuses pour la toxine tétanique, affinité que démontre l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*, il est permis de se demander si, en introduisant directement l'antigène au sein même de la substance nerveuse, il devient possible de créer l'immunité contre le tétanos.

Des tentatives ont été déjà faites en ce sens. C'est ainsi que Marie, en particulier, a tenté, sans succès toutefois, l'immunisation du lapin par injection de toxine tétanique pure dans le cerveau. Son échec s'explique aisément si l'on considère les difficultés que l'on éprouve, en général, à immuniser au moyen de toxines pures et la très grande sensibilité du cerveau du lapin à la toxine tétanique. (ROUX et BORREL). L'anatoxine tétanique nous a permis de réaliser très aisément l'immunisation du cobaye par voie intra-cérébrale (1).

La tolérance du cerveau est, en général, assez satisfaisante : l'injection dans un des hémisphères cérébraux de 0,1 c. c. chez le cobaye, de 0,5 c. c. d'anatoxine chez le lapin, ne donne lieu qu'à des phénomènes d'excitation immédiats et passagers, tels qu'en provoque l'injection d'une dose égale de bouillon. Si on double la dose, l'injection est suivie de mort dans 50% des cas environ.

60 cobayes de 350 grammes reçoivent chacun, après

(1) On réalise aussi très aisément, par la même voie, l'immunité antitétanique chez le lapin.

trépanation suivant la technique courante, (ROUX et BORREL), 0,1 c. c. d'anatoxine dans un des hémisphères. Ces cobayes sont divisés en trois lots égaux. Au bout de 20 jours, les cobayes du premier lot reçoivent, en injection intra-musculaire, des quantités variables de toxine tétanique : 1, 2, 5, 10, 20, doses mortelles. Parmi les sujets ainsi éprouvés jusqu'à 10 doses mortelles inclusivement, 30 % résistent sans tétanos local, 45 % présentent du tétanos local mais survivent, 25 % meurent de tétanos. Tous ceux qui reçoivent 20 doses mortelles présentent du tétanos local, la mortalité atteint, parmi eux, 50 %. Les témoins qui reçoivent des doses équivalentes de toxine, meurent, suivant la quantité reçue, du deuxième au quatrième jour après l'injection.

Le deuxième lot étant éprouvé dans les mêmes conditions mais au bout de 60 jours, le troisième au bout de 80 jours, à dater de l'injection vaccinnante, nous constatons, fait déjà signalé à propos de la vaccination par voie sous-cutanée, que l'immunité se renforce avec le temps. En effet, après 60 jours, éprouvés par l'injection de 10 doses mortelles de toxine, 60 % des vaccinés restent indemnes, les autres survivent malgré l'apparition de tétanos local. A 20 doses mortelles, tous ont du tétanos et 50 % succombent. Après 80 jours, jusqu'à 10 doses mortelles, 75 % des vaccinés résistent sans tétanos local, à 20 doses mortelles 50 % meurent encore de tétanos, 25 % présentent du tétanos local auquel ils survivent, mais 25 % restent indemnes de tout accident. Ces résultats sont comparables à ceux que permet d'obtenir la vaccination par voie sous-cutanée. Des cobayes ayant reçu, eux-aussi, 0,1 c. c. d'anatoxine, mais en injection sous-cutanée, sont éprouvés au bout de deux mois, en même temps que les cobayes du deuxième lot de l'expérience précédente : la morbidité et la mortalité par tétanos sont identiques dans les deux cas.

Ainsi, l'injection intra-cérébrale d'anatoxine vaccine et tout aussi bien que l'injection sous-cutanée.

La résistance conférée par l'injection intra-cérébrale dépend-elle de la présence d'antitoxine dans les humeurs, ou bien révèle-t-elle, soit exclusivement, soit accessoirement, un état particulier d'immunité du système nerveux ? Pour tenter de résoudre cette question nous avons prélevé, par ponction cardiaque, quelques centimètres-cubes de sang à des cobayes vaccinés par voie intra-cérébrale. Dans tous les sérums obtenus nous avons mis en évidence des quantités toujours appréciables et parfois considérables d'antitoxine.

Exemple : Sur 7 sérums provenant de cobayes vaccinés depuis deux mois, 6 sont capables de neutraliser de façon parfaite, *in vitro*, à la dose de 0,5 c. c., 2 doses mortelles de toxine tétanique (1). Les mélanges toxine-sérum, effectués dans ces proportions, sont inoffensifs pour les cobayes auxquels on les injecte. Le septième de ces sérums neutralise imparfaitement, au même taux, 1 dose mortelle de toxine. Le mélange, non mortel pour le cobaye, est encore capable cependant de donner du tétanos local. Les témoins qui reçoivent 2 doses mortelles meurent en 3 jours, une seule dose mortelle en 4 jours.

Autre exemple : 10 sérums provenant de cobayes vaccinés depuis 80 jours par injection intracérébrale de 0.1 c. c. d'anatoxine sont examinés de la façon suivante : une quantité fixe de toxine de 5 doses mortelles est mélangée à des dilutions diverses de chaque serum 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 c. c. Deux de ces sérums neutralisent la dose d'épreuve à 0,01 c. c., trois la neutralisent à 0,05

(1) Et sans doute, pour certains d'entre eux, une quantité de toxine plus considérable encore, l'essai de ces sérums n'ayant pas été poussé plus avant.

c. c., deux la neutralisent à 0,5 c. c., les trois autres ne neutralisent pas les 5 doses mortelles à 0,5 c. c.

L'injection intra-cérébrale d'anatoxine est donc suivie de l'apparition d'antitoxine dans les humeurs. Ajoutons que l'épreuve des cobayes qui ont fourni ces sérums montre que leur résistance est d'autant plus grande que leur sang est plus antitoxique.

Le tissu nerveux, ainsi sollicité, acquiert-il une résistance propre, a-t-il une part, et laquelle, dans la production de l'antitoxine? C'est ce que nous nous efforcerons de préciser dans un travail ultérieur.

e) COMPARAISON ENTRE L'ANATOXINE TÉTANIQUE ET DIVERS AUTRES ANTIGÈNES

Le pouvoir immunisant de l'anatoxine tétanique, dont nous avons montré la valeur, apparaît bien plus considérable si on le compare à celui de divers autres antigènes.

1) Toxines chauffées. Considérons une toxine et une anatoxine tétaniques ayant le même indice de flocculation de 0,70. Faisons de la toxine deux parts que nous chauffons, l'une à 60° pendant une heure, l'autre à 65° pendant un laps de temps égal. Prenons trois lots de 12 cobayes chacun et injectons à ceux du premier 0,1 c. c. d'anatoxine, à ceux du deuxième 0,1 c. c. de toxine chauffée à 65° à ceux du troisième 0,1 c. c. de toxine chauffée à 60°.

Dans les jours qui suivent nous constatons que les cobayes des deux premiers lots ne présentent rien d'anormal, ceux du troisième présentent du tétanos général dont ils guérissent mais qui montre que le chauffage à 60° n'a pas détruit entièrement la toxicité de la toxine.

Six semaines après avoir injecté ces cobayes, éprouvons-les tous de façon identique dans chaque lot, en leur injectant des quantités de toxine allant de 2 à 100 doses mortelles; des témoins étant faits pour chacune des quantités de toxine employée. Nous constatons les jours suivants que dans le premier lot (anatoxine) la mortalité atteint 35 %, elle est de 75 % dans le deuxième (toxine chauffée à 65°), de 100 % dans le troisième (toxine chauffée à 60°) dont les cobayes meurent du premier au quatrième jour comme les témoins.

Ceci nous montre, non seulement l'infériorité de la méthode du chauffage des toxines, déjà signalée à plusieurs reprises, mais encore nous permet d'affirmer, une fois de plus, qu'un reste de toxicité, loin de renforcer le pouvoir antigène et de favoriser l'apparition de l'immunité, semble plutôt, dans certains cas, constituer une entrave à la bonne marche de l'immunisation.

2) Toxines iodées. L'immunisation du cobaye par les mélanges iodés est assez difficile à réaliser. VAILLARD, dans ses premiers essais, signale la nécessité de multiplier le nombre des injections. OKUDA, opérant plus récemment, c'est-à-dire avec des toxines plus actives, ne parvient à réaliser cette immunisation que par l'injection de trois doses successives de mélanges toxine-Gram allant de 1 à 5 c. c. Encore les sujets vaccinés dans ces conditions ne résistent-ils, selon lui, qu'à l'injection d'une seule dose mortelle de toxine.

Nous nous bornerons à opposer à ces résultats ceux que nous avons obtenus au moyen d'une seule dose de 0,1 c. c. d'anatoxine. Nous avons pu, par ailleurs, nous rendre compte de la supériorité de l'anatoxine tétanique sur les antigènes iodés à l'occasion de l'immunisation et de l'hypermunisation du cheval. Tel protocole d'immunisation comportait 20 injections successives de

mélanges iodés divers avant qu'il fût possible d'injecter 0,05 c. c. de toxine pure. Nous verrons que, chez le cheval, deux injections de 10 et 20 c. c. faites à 15 jours d'intervalle peuvent permettre de créer une résistance qui confine à l'hyperimmunité et grâce à laquelle on peut, quelques jours après la deuxième intervention, injecter d'emblée de hautes doses de toxine pure.

3) Mélanges toxine-antitoxine. Rappelons l'impossibilité signalée par von EISLER et LOWENSTEIN, qu'il y a à immuniser activement le cobaye au moyen d'une seule injection d'un mélange de toxine et d'antitoxine, qu'il soit neutre, toxique ou antitoxique, et la facilité avec laquelle on y parvient au moyen d'une seule injection d'anatoxine. Dans un autre ordre d'idées, RAMON et LAFFAILLE ont montré que chez le cobaye, et chez le lapin, une injection d'un mélange d'anatoxine et d'antitoxine ne confère pas l'immunité.

VI

IMMUNISATION DU CHEVAL

Les résultats que nous avons obtenus chez le cobaye nous ont engagé à tenter l'immunisation du cheval par l'injection de faibles doses d'anatoxine. Les recherches que nous avons entreprises sur ce sujet montrent que la vaccination du cheval contre le tétanos est pratiquement réalisable, que l'injection de doses réduites d'anatoxine rend les sujets de cette espèce réfractaires, tant à une intoxication expérimentale sévère qu'à la maladie naturellement contractée. L'état actuel de ces recherches nous permet, en outre, d'apporter quelques précisions concernant les délais nécessaires à l'établissement de l'immunité, les modes de contrôle et d'appréciation de cette immunité, sa durée et les conditions pratiques de sa réalisation.

a) RÉSISTANCE A L'ÉPREUVE EXPÉRIMENTALE

1) Epreuve par la toxine pure. Un certain nombre de chevaux vaccinés soit par trois, soit par deux injections sous-cutanées d'anatoxine tétanique, ont été éprou-

vés par l'injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'une des toxines couramment utilisées à l'Institut Pasteur pour l'immunisation des chevaux producteurs de sérum antitétanique, et dont l'activité est toujours contrôlée sur le cobaye. Cette quantité de toxine représente à coup sûr plusieurs dizaines de doses mortelles pour un cheval neuf. Il s'agit donc d'une épreuve sévère. Notons, en outre, que, chez certains chevaux vaccinés par trois injections, la dose d'épreuve a été doublée.

Les chevaux utilisés dans ces expériences ont été préparés et éprouvés suivant des modalités dont voici l'exposé :

1^o) Dix chevaux reçoivent chacun trois injections de 20 c. c. chacune d'anatoxine, faites à 7 jours d'intervalle l'une de l'autre. Chacun de ces chevaux reçoit, 7 jours après la troisième injection, 1 c. c. de toxine pure.

2^o) Deux chevaux reçoivent chacun trois injections de 20, 20 et 30 cent. cubes d'anatoxine. Pour ces deux chevaux, un intervalle de sept jours a séparé chaque injection de la suivante. Ils reçoivent chacun, sept jours après la troisième injection, 2 cent. cubes de toxine tétanique.

3^o) Cinq chevaux reçoivent chacun deux injections d'anatoxine de 20 cent. cubes, faites pour chacun d'eux à sept jours d'intervalle l'une de l'autre. Sept jours après la deuxième injection, l'un d'eux reçoit, à titre d'épreuve, 1 cent. cube de toxine tétanique ; les quatre autres reçoivent une dose égale de toxine sept jours plus tard, soit quatorze jours après la deuxième injection.

4^o) Cinq chevaux reçoivent chacun deux injections de 20 c. c. d'anatoxine séparées par un intervalle de 14 jours. La dose d'épreuve de 1 c. c. de toxine leur est injectée 7 jours après la deuxième injection d'anatoxine.

5^o) Trois chevaux reçoivent chacun deux injections,

la première de 15, et la deuxième, sept jours plus tard, de 20 cent. cubes d'anatoxine. L'épreuve de leur immunité est faite quatorze jours après cette dernière injection. Elle consiste, comme pour les autres chevaux, en l'injection sous-cutanée de 1 cent. cube de toxine tétanique.

Tous ces chevaux ont parfaitement supporté l'injection de la dose d'épreuve de 1 ou de 2 cent. cubes de toxine. Aucun n'a présenté le moindre symptôme général ni local de tétanos. Tous ont, par la suite, reçu des doses progressivement croissantes de toxine tétanique et leur hyperimmunisation a été menée à bien sans que nous ayons eu à déplorer aucun accident.

Nous pouvons conclure que *deux injections de 20 c.c. (ou de 15 et 20 c. c.) d'une anatoxine telle que celle que nous avons employée suffisent pour créer, chez le cheval, en l'espace de deux ou trois semaines, un état d'immunité très satisfaisant.*

2) Epreuve par l'insertion d'échardes tétaniques.

Dans les conditions naturelles, les animaux n'ont pas à redouter le contact subit et brutal d'une quantité de toxine tétanique comparable à celle que nous avons utilisée dans l'expérience précédente. Ils sont exposés simplement à la souillure d'une plaie par des spores tétaniques associées à des germes et à des substances issus du milieu dont procèdent les spores elles-mêmes. Ces germes et ces substances associés contribuent à procurer aux spores les conditions nécessaires à leur germination et à la sécrétion de la toxine. Cette sécrétion *in vivo* de la toxine, il nous est impossible de l'apprécier exactement quant à son abondance et quant à sa qualité. De toute évidence cependant, elle ne saurait être soudaine, brutale, elle ne peut être que progressive. Dans ces conditions, pour que l'immunité soit

assurée, il faut et il suffit que l'organisme vacciné détruise ou, plus exactement, neutralise la toxine formée, jusqu'à ce que les moyens de défense dont il dispose aient mis les spores et les éléments mycéliens tétaniques hors d'état de nuire. L'état d'immunité suffisant à cette exigence ne semble donc pas devoir être nécessairement supérieur à celui qu'exige la neutralisation immédiate d'une énorme quantité de toxine brutalement introduite dans l'organisme. Il est probable que la neutralisation de la toxine se fait peu à peu, au fur et à mesure de sa formation, peut-être aussi au fur et à mesure de la formation corrélative de l'antitoxine. Etant donné que les vaccinés de l'expérience précédente ont résisté à une intoxication sévère, nous pensons pouvoir en induire que des chevaux vaccinés de façon analogue doivent résister à la maladie naturelle, même dans ses formes les plus graves. Et c'est en effet ce que l'expérimentation permet de vérifier.

Pour éprouver les chevaux que nous avons vaccinés à cet effet, nous avons utilisé des échardes préparées de la façon suivante :

Dans une culture de bacille tétanique âgée de trois semaines, riche en spores, sont introduits de petits fragments de bois, préalablement stérilisés. On agite le tube de temps en temps, pour bien répartir les spores dans toute la masse de la culture. Le lendemain, le tout est placé au bain-marie et y est maintenu pendant une heure trente minutes, à la température de 80°. Après quoi, les échardes sont plongées dans un mélange de trois cultures en milieu liquide de : staphylocoque, bacille pyocyanique, bacille de Friedländer. Les échardes sont prêtes à être employées. *Une écharde ainsi préparée donne toujours au cobaye un tétanos mortel.*

Les animaux à éprouver sont rasés à la partie moyenne de l'encolure, au niveau du muscle mastoïdo-

huméral. La région est soigneusement lavée et aseptisée. Un trocart à saignée, de fort calibre, est enfoncé au centre de la région ainsi préparée et poussé profondément jusque dans les muscles du noyau cervical. La tige du trocart retirée, une écharde est introduite dans la canule et la tige, remise en place, la pousse jusqu'au contact des tissus. Le trocart est retiré en bloc, la plaie qu'il laisse est recouverte de collodion.

L'écharde, placée dans ces conditions en plein tissu musculaire, n'a jamais été éliminée.

Ainsi avons-nous opéré pour deux des chevaux (1 et 2) que nous avons utilisés dans cette expérience. Pour les autres (3, 4, 5 et 6), afin de rendre l'épreuve plus sévère encore, nous avons en outre imprégné les échardes d'un sel de quinine.

1^o Deux chevaux, 1 et 2, reçoivent : 1, deux injections sous-cutanées d'anatoxine tétanique de 20 cent. cubes chacune, faites, la première le 26 juin, la deuxième le 10 juillet 1924; 2, deux injections de 10 cent. cubes de la même anatoxine, faites aux mêmes dates que pour 1.

Le 30 juillet ces deux chevaux reçoivent, en même temps qu'un témoin, chacun une écharde. Le 14 août, soit après une incubation de deux semaines, le cheval témoin présente les premiers signes d'un tétanos bientôt généralisé. Il meurt de tétanos le 27 août, après treize jours de maladie, tandis que les deux vaccinés restent indemnes et le sont encore aujourd'hui.

2^o Quatre chevaux 3, 4, 5 et 6, reçoivent respectivement les quantités suivantes d'anatoxine, la même que pour 1 et 2: 3, deux injections sous-cutanées de 10 cent. cubes chacune, faites le 26 juin et le 10 juillet 1924; 4 et 5, une seule injection de 10 cent. cubes le 26 juin; 6, une seule injection de 20 cent. cubes à la même date.

Le 4 novembre 1924, soit, suivant le cas, quatre mois ou quatre mois et demi après la vaccination, ces quatre

chevaux reçoivent chacun une écharde en même temps qu'un témoin.

Le 13 novembre, après neuf jours d'incubation, le cheval témoin présente du tétanos local du côté de l'insertion de l'écharde. En même temps, trismus, projection du corps clignotant. Les symptômes s'aggravent rapidement : le lendemain 14 novembre, le témoin est en décubitus latéral complet avec tous les signes du tétanos généralisé. Il meurt le 15, après deux jours de maladie.

Le 14 novembre, après dix jours d'incubation, le cheval 5, préparé par une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine, présente les premiers symptômes du tétanos. Ces symptômes s'aggravent le 15. Le 16, le tableau clinique du tétanos est complet, le cheval se couche ; il meurt le 17, après trois jours de maladie.

Le 18 novembre, après quatorze jours d'incubation, le cheval 6, préparé par une injection de 20 cent. cubes d'anatoxine, présente du tétanos local de l'encolure du côté de l'insertion de l'écharde. Le 19, pas de changement. Les jours suivants, les contractures s'aggravent, le tétanos restant toujours local. Le 29, l'encolure est complètement repliée sur elle-même, la tête ramenée à la hauteur du garrot. A cette date, l'animal se déplace encore aisément, il mange et boit, bien qu'avec difficulté, les aliments et les boissons qu'on lui présente. Il meurt le 2 décembre, après quinze jours de maladie.

Les chevaux 3 et 4 sont restés indemnes et vivent encore aujourd'hui. 3 avait reçu deux injections de 10 cent. cubes ; 4 une seule injection de la même quantité d'anatoxine.

Cette expérience, considérée dans son ensemble, nous montre :

1^o Que, chez les chevaux vaccinés par deux injections successives d'anatoxine (1, 2 et 3), l'immunité est tou-

jours satisfaisante. Nous ne relevons chez eux aucun cas de tétanos, même local;

2° Que chez ceux, par contre, qui ne reçurent qu'une injection d'anatoxine, l'immunité est le plus souvent défailante. Sur trois chevaux l'un, 5, meurt de tétanos aigu à évolution rapide; un autre, 6, meurt de tétanos, bien que le caractère local et la marche chronique de sa maladie montrent qu'il possédait cependant une certaine immunité. Un seul enfin, 4, résiste complètement. Nous pouvons constater, en outre, après bien d'autres, qu'il y a, entre les animaux de même espèce, des différences individuelles de réceptivité considérables. Un cheval préparé par une injection de 10 cent. cubes d'anatoxine résiste, alors que la même dose ne développe aucune immunité chez un second, et qu'une dose double ne donne à un troisième qu'une immunité très précaire et insuffisante.

b) CONTRÔLE DE L'IMMUNITÉ PAR LA RECHERCHE DE L'ANTITOXINE CHEZ LES VACCINÉS

S'il est commode d'éprouver les sujets vaccinés par l'injection d'une dose connue, fixe, de toxine tétanique, ou par l'insertion d'une écharde, ces procédés sont cependant critiquables et imparfaits. Ils sont toujours coûteux puisqu'ils comportent le sacrifice des sujets mal immunisés et des témoins. Ils ont, en outre, cet inconvénient grave, que les sujets éprouvés, soit par la toxine, soit par l'écharde, sont, en fait, des sujets sacrifiés au point de vue expérimental. L'une comme l'autre de ces épreuves constitue le terme ultime d'une expérience, car il n'est pas possible de suivre les progrès ou le déclin de l'état d'immunité chez des animaux éprouvés de la sorte. L'épreuve elle-même est de nature à modifier

l'état humoral des vaccinés, à renforcer leur résistance et à la prolonger dans le temps. Il devient nécessaire, si l'on a recours à de tels procédés d'information ou de contrôle, de multiplier le nombre des animaux d'expérience, ce qui, au point de vue économique tout au moins, est un obstacle sérieux. Pour remédier à ces inconvénients, l'idée vient immédiatement à l'esprit de contrôler et d'apprécier l'état d'immunité par la recherche de l'antitoxine dans les humeurs des vaccinés. C'est pourquoi nous nous sommes attaché à mettre en relief les deux points suivants :

1° La vaccination par l'anatoxine tétanique entraîne, chez le cheval, l'apparition d'antitoxine dans les humeurs;

2° L'immunité est dans l'étroite dépendance des qualités antitoxiques des humeurs.

Des expériences faites sur le cobaye montrent que, chez les sujets de cette espèce, l'injection d'anatoxine tétanique est suivie de l'apparition, dans les humeurs, de très notables quantités d'antitoxine. Il y a donc, chez le cobaye vacciné, des anticorps décelables. En est-il de même chez le cheval?

Pour résoudre cette question, capitale dans ce cas particulier, et d'ailleurs intéressante au point de vue purement spéculatif, le 4 novembre 1924, avant de les éprouver par le procédé de l'écharde, nous avons prélevé quelques centimètres cubes de sang aux chevaux 3, 4, 5 et 6, qui ont fait l'objet d'une étude antérieure. Nous avons pu ainsi contrôler, par deux procédés parallèles, l'immunité de ces sujets. Les résultats obtenus dans les deux cas ont d'ailleurs été exactement superposables.

Pour éprouver l'activité des sérums ainsi obtenus, nous avons mélangé une dose fixe de ces sérums, 2 cent. cubes, à des quantités variables de toxine tétanique : une demi-dose ou une dose mortelle (pour chacune de

ces quantités de toxine, et pour chaque sérum, deux cobayes ont été injectés : soit 4 cobayes par échantillon de sérum). Des témoins ont été faits pour chacune de ces deux quantités de toxine : ceux qui reçurent une demi-dose mortelle présentèrent du tétanos local, quarante-huit heures après l'injection; ceux qui reçurent une dose mortelle, présentèrent du tétanos local après vingt-quatre heures d'incubation et moururent cinq jours après l'injection.

Pour rendre plus démonstratif le parallélisme des résultats que nous avons obtenus par l'épreuve de l'écharde et par le titrage de l'antitoxine, nous placerons côte à côte, pour chaque cheval, les résultats obtenus dans ces deux ordres d'expérience. De cette façon, on peut se rendre compte aisément que l'immunité, traduite par la résistance à l'épreuve de l'écharde, coïncide avec la présence d'antitoxine dans le sérum; que l'absence d'antitoxine coïncide avec l'absence de l'immunité.

Le cheval 3, qui a reçu deux injections de 10 cent. cubes d'anatoxine, a parfaitement résisté à l'épreuve de l'écharde. Parallèlement, les cobayes sur lesquels a été contrôlée l'activité de son sérum ont tous résisté. Aucun n'a présenté le moindre symptôme de tétanos.

Le cheval 4 a reçu une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine; il a résisté à l'épreuve de l'écharde. Si nous nous référons au titrage de son sérum, nous voyons que celui-ci renferme en effet de l'antitoxine, quoique en plus faible quantité cependant que le précédent. Si le mélange toxine-sérum renfermant une demi-dose mortelle n'a pas donné au cobaye de tétanos local, le mélange renfermant une dose mortelle se révèle encore toxique. Les cobayes qui l'ont reçu ont présenté du tétanos local, tardif et fruste, auquel ils ont d'ailleurs survécu.

Le cheval 6, qui a reçu une injection de 20 cent.

cubes d'anatoxine, a présenté, après insertion de l'écharde, un tétanos local, tardif, mais grave, auquel il a succombé. Le caractère de sa maladie dénote cependant une certaine résistance. Ceci est parfaitement confirmé par le titrage de son sérum. Ce sérum renferme certainement de l'antitoxine, mais en quantité beaucoup plus faible que les deux précédents. L'injection du mélange toxine-sérum renfermant une demi-dose mortelle n'a pas provoqué de tétanos local chez les cobayes qui l'ont reçu; le mélange renfermant une dose mortelle a non seulement provoqué du tétanos local, mais encore amené la mort des cobayes les septième et huitième jours à dater de l'injection, c'est-à-dire avec retard par rapport aux témoins. Cela montre que, *si la présence de l'antitoxine est toujours corrélative de l'immunité, elle ne suffit pas à l'assurer; son abondance seule est la raison nécessaire de la résistance conférée. Il faut non seulement de l'antitoxine, mais encore assez d'anti-toxine.*

Le cheval 5 a reçu une seule injection de 10 cent. cubes d'anatoxine. Il est mort de tétanos aigu à la suite de l'épreuve de l'écharde. Or, son sérum ne renfermait pas d'antitoxine, ou il en renfermait si peu qu'elle n'a pu être mise en évidence dans les conditions de notre expérience. Les cobayes, qui ont reçu les mélanges toxine-sérum, renfermant une demie et une dose mortelle, ont présenté des contractures locales et ont succombé dans les mêmes délais que les témoins.

Ainsi, la vaccination antitétanique du cheval par de faibles doses d'anatoxine amène, chez les vaccinés, la formation d'antitoxine. Cette antitoxine peut être non seulement décelée, mais encore titrée, à une certaine période tout au moins. Le titrage sommaire de l'antitoxine nous permet de confirmer nos conclusions antérieures :

L'injection double vaccine efficacement.

L'injection unique vaccine médiocrement.

Les différences individuelles sont considérables.

Le titrage de l'antitoxine apparaît très supérieur à tous les autres procédés d'appréciation de l'immunité. Il permet notamment de faire, entre les animaux, des différences que l'écharde ne permet pas d'apprécier (exemple chevaux 3 et 4). Il n'a, semble-t-il donc, que des avantages, aussi nous pensons que c'est à lui qu'il faut recourir pour apprécier l'immunité dans le cas qui nous occupe.

Du point de vue purement spéculatif, cette expérience suggère quelques réflexions : on a coutume d'admettre, de façon courante, que l'état d'immunité peut exister alors qu'il nous est impossible de déceler, par nos moyens évidemment grossiers, la présence de l'anticorps. *En ce qui concerne le tétanos, nous pensons qu'il n'y a pas, chez les espèces sensibles, d'immunité activement acquise sans antitoxine humorale aisément décelable.* Bien mieux, nous constatons que des quantités appréciables d'antitoxine n'empêchent pas l'organisme, qui a fait les frais de leur production, de rester sensible aux atteintes de la maladie. Cette constatation a d'ailleurs été faite à maintes reprises par ceux qui pratiquent l'hyperimmunisation du cheval. Ils ont pu remarquer, en effet, l'apparition du tétanos local et même du tétanos général chez des sujets dont l'organisme renferme cependant de l'antitoxine en quantités relativement abondantes.

Toutes les fois que nous avons recherché l'antitoxine chez des animaux vaccinés (cobayes ou chevaux), nous n'avons eu aucune peine à la mettre en évidence lorsque ces sujets possédaient l'immunité.

Aussi retiendrons-nous, pour le moment du moins, les seules modifications humorales comme révélatrices de l'état d'immunité.

c) DÉLAIS D'APPARITION DE L'ANTITOXINE
CHEZ LES VACCINÉS

Nous savons déjà, et c'est d'ailleurs là une notion courante, que l'immunité antitétanique est assez lente à apparaître en général. Si certains antigènes provoquent très rapidement l'apparition d'anticorps chez le cheval, si, notamment, l'anatoxine diphtérique est susceptible, comme l'a montré RAMON, d'amener, la production de quantités considérables d'antitoxine en quelques jours, voire même en quelques heures, nous n'avons pu, pour notre part, obtenir rien d'approchant avec l'anatoxine tétanique. Nous verrons que des doses énormes d'anatoxine (près d'un litre) n'ont pas amené, chez le cheval, l'apparition d'antitoxine décelable avant un délai variant de 13 à 17 jours. Ce délai constitue, à notre avis, le minimum dans lequel on puisse parvenir, en l'état actuel de nos moyens, à immuniser le cheval contre le tétanos. Nous avons vu, en effet, que 14 jours et même 7 jours après une deuxième injection d'anatoxine l'immunité du cheval est constituée et lui permet de résister à une épreuve sévère. Il est des cas cependant où le délai de 7 jours est à peine suffisant, ainsi qu'en témoignent les faits suivants :

10 chevaux, dont nous avons entrepris l'hyperimmunisation, avaient reçu, chacun, à 7 jours d'intervalle l'une de l'autre, deux injections d'anatoxine de 20 et 30 c. c. d'anatoxine. 7 jours après la deuxième injection, deux de ces chevaux reçoivent, en injection sous-cutanée, l'un 2 c. c. de toxine pure, l'autre 1 c. c. seulement. Cinq jours après cette inoculation, le cheval qui avait reçu 2 c. c. de toxine présenta les premiers signes d'un tétanos rapidement généralisé qui l'emporta en 48 heu-

res. L'autre, qui n'avait reçu que 1 c. c. de toxine, présenta, le neuvième jour, un tétanos localisé de l'encolure qui n'entrava d'ailleurs aucunement la marche de son hyperimmunisation. Les autres chevaux de ce lot reçurent une troisième injection d'anatoxine puis, 7 jours plus tard et sans accident consécutif, 1 c. c. de toxine pure. Nous nous sommes rendu compte, par la suite, qu'il aurait suffi d'espacer davantage les injections d'anatoxine et aussi d'attendre quelques jours de plus avant d'éprouver ces sujets pour éviter, à coup sûr, ces regrettables accidents. Remarquons d'ailleurs que les quantités de toxine injectées à ces deux chevaux équivalaient respectivement à 50 et 100 doses mortelles environ pour un cheval neuf. Le fait pour l'un d'eux d'avoir présenté du tétanos purement local dénote de sa part une résistance déjà grande.

Même en allongeant la période qui sépare les deux injections, il peut arriver, assez exceptionnellement d'ailleurs, que l'immunité ne soit pas constituée avant dix jours à la suite de la deuxième injection. C'est ce que montre précisément l'expérience dont voici l'exposé :

4 chevaux reçoivent chacun deux injections de 10 c. c. d'anatoxine espacées de 15 jours. Un deuxième lot de quatre chevaux est préparé par injection à chaque cheval de deux doses égales de la même anatoxine en ménageant un mois entre les deux injections. Parmi les chevaux du premier lot, l'un avait déjà de l'antitoxine au moment où a été faite la deuxième injection; les trois autres ne présentèrent d'antitoxine dans leurs humeurs, l'un que 12 jours, les deux autres que 8 jours après la deuxième injection. Parmi les chevaux du deuxième lot, aucun ne présenta d'antitoxine dans ses humeurs à la suite de la première injection. Le sérum de ces chevaux ne se révéla antitoxique que 10 jours après la deuxième injection d'anatoxine.

Ceci corrobore ce que nous disions de la lenteur avec laquelle s'établit l'immunité contre le tétanos. Nous compterons donc, pour faire la plus large place aux variations individuelles, que *l'immunité peut être considérée comme acquise dans les 10 ou 15 jours qui suivent la deuxième injection d'anatoxine*. Si, donc, nous ménageons entre les deux injections un intervalle de 15 jours (et c'est un minimum) il nous faudra au moins, dans ces conditions, trente jours pour vacciner un cheval. Remarquons que ce délai est à peine supérieur à ceux que nécessitent les vaccinations couramment pratiquées chez les animaux.

d) DURÉE DE L'IMMUNITÉ

La lenteur avec laquelle s'établit puis s'accroît l'immunité contre le tétanos nous permettait d'espérer qu'elle n'est pas inférieure en durée à celle que déterminent les vaccinations couramment pratiquées en médecine vétérinaire. Nous avons pu constater, en effet, que l'immunité antitétanique active a une durée au moins égale à une année. Rappelons à ce sujet que VAILLARD avait déjà signalé que, chez le cobaye, la durée de cette immunité n'est pas inférieure à une année.

Un certain nombre de chevaux avaient reçu chacun deux injections de 5 c. c. d'anatoxine, espacées l'une de l'autre par un intervalle de trois semaines. Une première prise de sang avait été effectuée deux semaines après la deuxième injection d'anatoxine. Un titrage sommaire avait révélé la présence constante d'antitoxine dans tous les sérums obtenus. Par la suite, de nouvelles saignées et de nouveaux titrages nous ont montré que l'immunité des sujets vaccinés, mesurée par le titre antitoxique de leur sérum, s'est encore accrue jusqu'à un maximum.

A partir du sixième mois cette immunité a décliné, mais au bout d'un an elle était encore supérieure cependant à ce qu'elle était lors du premier titrage, effectué quatorze jours après la vaccination.

Voici les résultats des titrages des sérums fournis par l'un de ces chevaux :

Première saignée : 14 jours après la vaccination ;
3 c. c. de sérum neutralisent parfaitement, *in vitro*, 1 dose mortelle de toxine et imparfaitement 2 doses mortelles. Le cobaye qui reçoit ce dernier mélange présente du tétanos local mais survit.

Deuxième saignée : 5 mois après la vaccination ;
1 c. c. seulement de sérum suffit à neutraliser largement 5 doses mortelles de toxine. Le cobaye qui reçoit le mélange ne présente aucun symptôme de tétanos.

Troisième saignée : 7 mois après la vaccination ;
1 c. c. de sérum ne neutralise plus qu'imparfaitement 5 doses mortelles. Le cobaye qui reçoit le mélange présente du tétanos local mais survit.

Quatrième saignée : 12 mois après la vaccination ;
1 c. c. de sérum neutralise encore parfaitement 1 dose mortelle de toxine. Un tel taux d'antitoxine dans les humeurs d'un cheval suffit, très largement à assurer l'immunité.

Il eut été intéressant d'attendre, chez de tels chevaux, la disparition de toute propriété antitoxique du sérum et de rechercher, à ce moment, si ces sujets étaient encore capables de résister à l'insertion d'une écharde tétanique. Faute de pouvoir réaliser cette expérience dont le puissant intérêt théorique et pratique ne nous a point échappé, nous avons fait subir à nos vaccinés de nouvelles injections d'anatoxine. Nous aurons à revenir bientôt sur les résultats que nous a donnés cette nouvelle vaccination.

e) INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS
SUR L'IMMUNISATION DU CHEVAL

1) L'antigène et son mode d'utilisation. — a) LA DOSE. Nous pouvons répéter, sur ce point, au sujet du cheval, ce que nous avons dit au sujet du cobaye : que la dose d'antigène a une importance réelle mais que cette importance est relative. Nous avons vu que l'injection d'une dose unique de 10 à 20 c. c. d'anatoxine ne confère que très exceptionnellement une immunité satisfaisante au cheval. De très nombreux essais ont très régulièrement confirmé ces résultats. On peut cependant, à vrai dire, vacciner à coup sûr le cheval au moyen d'une seule injection d'anatoxine. Il suffit que la dose employée soit assez considérable. C'est ce que montre l'expérience que nous allons rapporter : —

Trois chevaux : 7, 8, et 9 reçoivent respectivement en une seule injection : 7, 200 c. c.; 8, 400 c. c.; 9, 800 c. c. d'une même anatoxine. Dans les semaines qui ont suivi cette injection, une saignée de quelques centimètres-cubes est faite chaque jour à chacun de ces trois chevaux. Le titrage des sérums obtenus a été fait de la façon suivante : chaque échantillon de sérum est mélangé, à la dose fixe de 2 c. c., à 1 c. c. d'une dilution de toxine, quantité représentant 1 dose mortelle pour un cobaye neuf de 300 grammes.

L'activité de la dose d'épreuve de toxine est, comme à l'ordinaire, contrôlée sur des cobayes de poids égaux qui succombent en quatre jours. L'observation des cobayes qui reçoivent les mélanges toxine-sérum montre que la neutralisation parfaite de la toxine n'est obtenue pour le cheval 9 qu'avec le sérum du treizième jour,

avec celui du dix-huitième jour pour 8, avec celui du vingtième jour pour 7.

Il est donc possible de vacciner le cheval au moyen d'une dose unique, massive, d'anatoxine. L'immunité apparaît, dans ces conditions, entre la deuxième et la troisième semaine après l'injection. Elle n'est pas supérieure à celle qu'on peut obtenir au moyen de deux injections de 10 et 20 c. c. d'anatoxine et demande aussi longtemps pour se constituer que celle-ci. Remarquons cependant que, chez ces trois chevaux, l'immunité est apparue d'autant plus vite que la quantité d'anatoxine injectée a été plus forte.

Un procédé de vaccination exigeant l'emploi d'une telle quantité d'antigène n'aurait, est-il besoin de le dire, aucune chance d'être adopté.

b) LA RÉPÉTITION DES INJECTIONS. Nous avons déjà insisté à plusieurs reprises sur ce fait que, pour déterminer chez le cheval une immunité satisfaisante, il est nécessaire de pratiquer à un certain intervalle deux injections successives d'anatoxine. L'expérience dont l'exposé va suivre n'en sera qu'une nouvelle démonstration.

Neuf chevaux ont été préparés de la façon suivante :

Deux chevaux, 10 et 11, reçoivent une injection de 15 cent. cubes d'anatoxine.

Deux chevaux, 12 et 13, reçoivent une injection de 10 cent. cubes d'anatoxine.

Deux chevaux, 14 et 15, reçoivent une injection de 5 cent. cubes d'anatoxine.

Trois chevaux, 16, 17 et 18, reçoivent chacun deux injections de 5 cent. cubes d'anatoxine, un intervalle de vingt jours ayant été ménagé entre ces deux interventions.

Ces neuf chevaux ont été saignés : 10, 11, 12, 13, 14 et 15, cinq semaines après la date à laquelle ils ont

été injectés; 16, 17 et 18, deux semaines après la deuxième injection. Nous avons, dans les sérums obtenus, recherché la présence de l'antitoxine en opérant de la façon suivante :

Chaque sérum est mélangé, à la dose fixe et uniforme de 3 cent. cubes, à des quantités variables de toxine tétanique : 0,2, 0,5, 1, 2 doses mortelles. Les mélanges, après trente minutes de contact à la température du laboratoire, sont injectés à des cobayes de 300 grammes. En même temps, des cobayes témoins reçoivent des doses correspondantes de toxine. Ces témoins présentent du tétanos local après quarante-huit heures d'incubation pour 0,2 et 0,5 dose mortelle; après vingt-quatre heures, pour 1 et 2 doses mortelles. Chez ces derniers, la mort survient en quatre jours pour 2 doses mortelles, en cinq jours pour 1 dose mortelle.

L'observation des cobayes qui reçoivent les mélanges toxine-sérum montre que l'antitoxine est présente, et en notables quantités, chez les chevaux 16, 17 et 18, qui reçurent deux injections de 5 cent. cubes d'anatoxine. Elle fait défaut chez ceux qui ne reçurent qu'une seule injection, quelle que soit la dose d'anatoxine injectée. A peine en trouve-t-on des traces chez deux d'entre eux seulement, 10 et 14, dont le sérum, à la dose de 3 cent. cubes, ne neutralise que 0,2 dose mortelle. Les sérums 16 et 18, employés à la même dose, neutralisent complètement 1 dose mortelle; le mélange renfermant 2 doses mortelles est encore toxique et mortel pour le cobaye. 3 cent. cubes du sérum 17 neutralisent parfaitement 2 doses mortelles; le mélange injecté au cobaye ne donne même pas de tétanos local.

Cette expérience montre, une fois de plus, la nécessité qu'il y a de pratiquer deux injections vaccinales. Elle montre également que l'on peut employer avec un plein succès des doses d'anatoxine plus réduites encore

que celles que nous avons utilisées jusque là. Ajoutons que l'anatoxine utilisée pour vacciner ces chevaux n'avait qu'une valeur antigène assez faible son indice de flocculation n'étant que de 0,35.

c) LE DÉLAI MÉNAGÉ ENTRE LES INJECTIONS. Nous avons déjà signalé, à propos de l'immunisation du cheval, que la répétition des injections importe bien plus que la quantité absolue d'anatoxine injectée : deux injections successives de 5 c. c. donnent, nous venons de le voir, des résultats bien supérieurs et bien plus constants qu'une seule injection de 20 c. c. de la même anatoxine. Mais, pour obtenir de bons résultats, il ne suffit pas de multiplier le nombre des injections, il faut, en outre, les pratiquer à un certain rythme. Nous disions que, chez le cobaye, il y a avantage à espacer très notablement deux injections successives d'anatoxine; cette indication est encore plus importante lorsqu'on immunise le cheval.

Nous avons montré avec RAMON que des chevaux qui reçoivent à un mois d'intervalle deux injections successives d'anatoxine fournissent, douze jours après la deuxième injection, un sérum capable de neutraliser 300 doses mortelles de toxine au centimètre-cube, alors que d'autres chevaux qui reçoivent successivement à quatre ou cinq jours d'intervalle des doses d'anatoxine telles que 5, 10, 20, 35, 50 et 100 c. c. ne donnent, malgré le nombre des injections et malgré la quantité absolue d'antigène injectée, qu'un sérum capable de neutraliser 200 doses mortelles au centimètre-cube.

Ajoutons que si nous avons réussi à conférer l'immunité au cheval au moyen de deux injections d'anatoxine espacées de huit jours l'une de l'autre, il arrive parfois que les sujets ainsi traités n'aient qu'une immunité précaire. Rappelons à ce sujet le cas de deux chevaux vaccinés dans ces conditions (p. 60) qui reçurent,

huit jours après la deuxième injection l'un 2 c. c., l'autre 1 c. c. de toxine pure. Le premier mourut de tétanos général, alors que le second fit un tétanos local non mortel.

De tels accidents ne nous sont jamais arrivés lorsque nous avons laissé entre les deux injections d'antigène une période de deux, de trois ou mieux de quatre semaines. Il y a là une indication dont il faut tenir compte dans l'établissement de la technique de la vaccination du cheval.

d) LA NATURE DE L'ANTIGÈNE ET SON ACTION LOCALE. Nous avons vu que la valeur de l'immunité dépend de la valeur flocculante des antigènes employés. Alors qu'une anatoxine médiocre, dont l'indice de flocculation est par exemple de 0,35, permet d'obtenir chez le cheval, au moyen de deux injections, un sérum capable de neutraliser quelques doses mortelles au centimètre-cube, une anatoxine forte, dont l'indice est par exemple de 0,80, permet d'obtenir, en opérant dans des conditions strictement identiques, des sérums capables de neutraliser des dizaines de doses mortelles à la même dose.

Mais nous avons montré avec RAMON qu'on peut, aussi au moyen d'une même anatoxine tétanique, obtenir des résultats tout à fait différents suivant que l'anatoxine est injectée telle quelle ou qu'on la modifie par un artifice très simple, l'adjonction de poudre de tapioca stérilisée; voici comment nous avons été amenés à utiliser cette substance :

Nous avons toujours été frappés, à la fois, par la difficulté et par la lenteur au prix desquelles on fait produire au cheval de l'antitoxine tétanique et par la rapidité et la facilité avec lesquelles on parvient à lui faire produire de l'antitoxine diphtérique. Nous savions d'autre part et nous remarquons tous les jours, que l'injection de toxine tétanique n'est suivie que d'une

réaction locale faible ou nulle tandis que l'injection de toxine diphtérique s'accompagne de phénomènes inflammatoires locaux très accusés et parfois très graves. Le rapprochement de tous ces faits d'observation nous avait fait penser que, dans le cas d'une injection de toxine ou d'anatoxine tétanique, l'absence de réaction locale favorise l'absorption rapide de l'antigène dont la majeure partie s'élimine vraisemblablement sans avoir été utilisée par l'organisme.

Or, au cours de titrages de sérums antidiphtériques, RAMON constate, un jour, que le titre antitoxique du sérum de certains chevaux, qui fournissaient de l'antitoxine diphtérique depuis déjà longtemps, s'est accru brusquement d'une saignée à la suivante dans des proportions considérables. Recherchant les causes de ce phénomène tout à fait insolite, RAMON remarque que tous les chevaux qui ont donné lieu à de telles constatations ont présenté, à la suite des dernières injections d'antigène de volumineux abcès. Après avoir fait à plusieurs reprises des constatations analogues, il attribue, avec raison, cette hausse brusque du titre des sérums aux phénomènes inflammatoires anormaux qui se sont produits au niveau des dernières injections. * De là à penser qu'en provoquant artificiellement des phénomènes analogues, lors d'injections d'antigène, on déterminerait une plus intense production d'anticorps, il n'y avait qu'un pas.

C'est ainsi que nous fûmes conduits à incorporer à nos antigènes diverses substances capables à la fois de les fixer et de retarder leur résorption, capables en outre par leur action locale de provoquer les phénomènes inflammatoires recherchés. Nous avons utilisé successivement : du pus, de la mie de pain finement divisée, du mellins food, de la poudre de tapioca. Cette dernière substance nous donna les résultats escomptés. Ces résul-

tats ont fait l'objet de la part de RAMON, soit seul, soit en collaboration avec nous-même, de publications diverses. Nous n'y reviendrons pas ici. Nous nous bornerons à rappeler que *l'emploi du tapioca permet, toutes conditions égales, d'obtenir des résultats environ dix fois supérieurs à ceux que l'on obtient au moyen de l'anatoxine seule.*

Exposons maintenant, en quelques mots, la technique de ce procédé et les phénomènes consécutifs à son emploi.

De la poudre de tapioca, finement broyée et soigneusement stérilisée à sec, est incorporée à l'anatoxine. Lorsque tous les grains de tapioca sont bien imprégnés d'anatoxine, ce dont on se rend compte à leur état parfait de division quand on agite le mélange, on injecte la totalité du mélange sous la peau, au niveau de l'encolure ou en arrière de l'épaule. Dans les heures et jours qui suivent cette injection, on peut faire les constatations suivantes : Au point d'injection apparaissent les signes cardinaux de l'inflammation, la région est tuméfiée, tendue, chaude, douloureuse à la palpation. Si la dose injectée est forte (50, 100, 200 c. c. ou plus), un œdème déclive considérable envahit les membres antérieurs et remonte le long de la paroi abdominale inférieure. Autour de la tumeur, très volumineuse dans ce cas, irradie un réseau de gros troncs lymphatiques dont la turgescence témoigne d'une activité leucocytaire très intense. L'animal est abattu, se déplace difficilement, évite les contacts, fuit les attouchements. Lorsque l'injection est correctement faite, ces phénomènes s'amendent en quelques jours mais il persiste cependant, parfois, au point d'injection une induration qui s'efface peu à peu. Parfois aussi le processus inflammatoire évolue vers la suppuration. Il se produit alors un abcès qu'il est nécessaire d'inciser. Cet accident n'est

pas constant, on l'évite en prenant les précautions d'asepsie nécessaires.

L'emploi de faibles doses (2 à 10 c. c.) n'entraîne jamais de phénomènes aussi graves. C'est seulement lors d'injection de fortes doses, telles que celles que nous utilisons pour les chevaux en voie d'hyperimmunisation qu'ils apparaissent avec toute l'acuité que nous venons de signaler.

Sans prétendre éclaircir entièrement le déterminisme de cette action, au moins inattendue, d'une substance aussi banale que le tapioca, nous pensons qu'indépendamment de toute action générale possible, le tapioca agit, à la fois, par son pouvoir absorbant qui lui permet de retenir, de fixer l'antigène, par la résistance qu'il oppose lui-même à la résorption et par l'importance de la réaction locale qu'il détermine. L'antigène trouve ainsi, vraisemblablement, sur place, du fait de la réaction provoquée, toutes les conditions et tous les éléments nécessaires à sa meilleure utilisation.

2) L'organisme. Laissant de côté des facteurs sans importance tels que la race, le sexe, la taille, le poids, nous n'envisagerons ici que l'âge, l'état de santé, les antécédents morbides des sujets soumis à la vaccination. Ceci pour les sujets neufs. Nous envisagerons, en outre, deux cas particuliers dans lesquels l'organisme est susceptible de réagir de façon spéciale aux injections d'anatoxine, soit par suite de vaccinations antérieures, soit du fait d'injections de sérum antitétanique pratiquées avant ou pendant la période d'immunisation.

a) L'AGE. Il sera prudent d'écarter de la vaccination les animaux très âgés, non que la vaccination antitétanique puisse constituer un danger pour eux, mais parce que l'état de leur organisme ne leur permet pas de réagir convenablement à l'injection d'un vaccin. La pra-

tique de l'hyperimmunisation nous a montré que de tels sujets sont peu aptes à produire des anticorps. Une vaccination pratiquée dans ces conditions ne donnerait, le plus souvent qu'une fausse sécurité. *L'épuisement sénile commandera donc l'abstention.*

b) L'ÉTAT DE SANTÉ. Nous en dirons tout autant des sujets atteints de maladies aiguës ou d'affections chroniques graves (gourme, pneumonie, anémie infectieuse etc.). Il ne faudra pas oublier non plus que certaines lésions viscérales aiguës ou chroniques, en particulier les lésions hépatiques, qui, ainsi que l'a montré H. VINCENT, accroissent très notablement la sensibilité à certaines infections, et singulièrement la réceptivité au tétanos, peuvent faire obstacle à l'immunisation. Il est de notion courante qu'un cheval qui a fourni pendant longtemps du sérum antidiphtérique, par exemple, ne peut faire, le plus souvent, qu'un très médiocre producteur d'antitoxine tétanique. Rappelons précisément que, chez de tels chevaux, les lésions du foie, de la rate, de la moelle osseuse sont classiques. Or, nous avons tenté l'immunisation de trois chevaux, anciens producteurs d'antitoxine diphtérique. Ces trois chevaux qui avaient reçu chacun trois injections de 20 c. c. d'anatoxine, n'ont pu résister à l'injection de 1 c. c. de toxine pure. Ils présentèrent les premiers signes du tétanos 6 jours après l'injection et moururent en 24 heures. Si des lésions aussi massives que celles dont ces chevaux étaient porteurs se rencontrent rarement dans la pratique, il ne faut pas oublier que l'existence connue ou méconnue de lésions du même ordre peut faire échec à la vaccination.

c) LES ANTÉCÉDENTS MORBIDES. Hors le cas exceptionnel ou des maladies antérieures auront pu déterminer des lésions analogues à celles que nous venons d'envisager, leur importance sera négligeable. Nous n'envisa-

gerons qu'une seule maladie et ce sera précisément le tétanos. Nous avons rappelé que les récidives du tétanos sont possibles et nous avons signalé que l'injection expérimentale de doses infra-mortelles de toxine tétanique conduit le plus souvent, selon tous les auteurs, à l'hypersensibilité. Cette hypersensibilité étant une règle quasi-absolue chez le cheval, on peut se demander si un cheval guéri d'un tétanos antérieur, récent ou ancien, est capable de s'immuniser aussi bien qu'un sujet neuf. Rapportons à ce propos ce fait, qui nous a été signalé par feu A. PREVOT, que les chevaux qui présentent du tétanos local au cours de leur période d'immunisation ne sont par la suite, en général, que de médiocres producteurs de sérum antitétanique.

En l'absence de tout document personnel relatif à cette question, dont l'intérêt est surtout théorique, nous nous bornons à la signaler, nous réservant, si les circonstances nous le permettent quelque jour, de la trancher.

d) LES VACCINATIONS ANTÉRIEURES. Nous avons montré que l'immunité acquise à la suite de deux injections d'anatoxine s'accroît jusqu'à un maximum, décline progressivement à partir du sixième mois mais reste encore très appréciable au bout d'un an. C'est ainsi qu'un cheval ayant reçu deux injections de 5 c. c. d'anatoxine a fourni, six mois plus tard, un sérum dont 1 c. c. était capable de neutraliser, *in vitro*, une quantité de toxine tétanique cinq fois mortelle pour le cobaye et au bout d'un an, un sérum qui à la même dose de 1 c. c. neutralisait encore parfaitement 1 dose mortelle de toxine.

En vue de rechercher comment se comportent de tels sujets lorsqu'ils sont soumis à de nouvelles injections vaccinales, nous avons injecté à des chevaux vaccinés un an auparavant d'abord 10 c. c. d'anatoxine pure, puis sept jours plus tard, et immédiatement après leur

avoir prélevé quelques centimètres cubes de sang, une dose égale de la même anatoxine, additionnée cette fois de poudre de tapioca stérilisée. Une deuxième saignée a été effectuée sept jours après cette dernière injection.

Voici, à titre d'exemple, les résultats fournis par le titrage des sérums provenant de l'un de ces chevaux.

Première saignée, 7 jours après injection de 10 c. c. d'anatoxine : 1 c. c. de sérum neutralise parfaitement, in vitro, 10 doses mortelles de toxine tétanique. L'injection du mélange au cobaye n'est suivie d'aucun accident.

Ainsi, 7 jours seulement après une seule injection d'anatoxine pure, le titre antitoxique du sérum de ce cheval, en décroissance très nette depuis six mois, est passé de 1 à 10, atteignant de la sorte le double du maximum auquel il était parvenu à la suite de sa première vaccination. (Rappelons ici que l'injection à un sujet neuf de la même espèce d'une dose égale d'anatoxine n'amène le plus souvent, aucune modification humorale décelable).

Deuxième saignée, 7 jours après l'injection de 10 c. c. d'anatoxine au tapioca : 0,02 c. c. de sérum neutralisent parfaitement, in vitro, 100 doses mortelles de toxine. Un cheval dont les humeurs sont aussi riches en antitoxine peut supporter impunément de hautes doses de toxine pure.

Notons ici que les sujets qui ont fait l'objet de cette expérience étaient inclus dans un lot de chevaux dont nous entreprenions l'hyperimmunisation. Le rythme hebdomadaire des injections auquel nous étions assujettis nous a obligé à effectuer nos prises de sang 7 jours seulement après chaque injection, c'est-à-dire à un moment où, d'après ce que nous savons de l'immunisation antitétanique du cheval, ces injections étaient encore loin d'avoir produit leur plein effet. Il est à peu près certain que, si nous avions, dans chaque cas, attendu

une ou deux semaines de plus, les résultats auraient été encore meilleurs.

En vue de comparer ces résultats à ceux que l'on peut attendre de la sérothérapie, nous avons injecté à un cheval du poids de 500 k^{os} environ, 10 c. c. de sérum antitétanique. (Tel qu'il est délivré par l'Institut Pasteur pour la médecine des animaux).

Quatre jours après cette opération, un titrage nous a montré que 1 c. c. du sérum de ce cheval neutralisait à peine 10 doses mortelles de toxine au centimètre-cube. Le sérum obtenu quinze jours après l'injection ne neutralisait plus que 1 dose mortelle au centimètre-cube. Il serait intéressant de faire des recherches analogues sur des animaux autres que le cheval, recevant des sérums hétérologues et soumis antérieurement à de multiples injections sériques.

Ces considérations nous portent à penser que la vaccination antitétanique, si elle était systématiquement et judicieusement pratiquée, permettrait de lutter plus efficacement encore contre le tétanos que la sérothérapie. D'ores et déjà nous pensons qu'il y aurait avantage, chez des sujets vaccinés depuis longtemps et dont l'immunité pourrait être défaillante, à pratiquer en cas de blessure, non pas une injection d'antitoxine, mais une injection d'anatoxine tétanique.

e) LES INJECTIONS DE SÉRUM ANTITÉTANIQUE. Les chevaux récemment soumis à une injection de sérum antitétanique devront être écartés temporairement de la vaccination. L'antitoxine que leur organisme a reçu est susceptible, en effet, de se combiner à l'anatoxine, de la saturer en totalité ou en partie, compromettant ainsi les résultats de la vaccination. Il faudra à cet égard se souvenir que le cheval, recevant des sérums homologues, élimine très lentement les anticorps qui lui sont apportés avec le sérum.

Cinq semaines, et même plus, après une injection de sérum, on peut encore mettre en évidence dans les humeurs du cheval des traces très appréciables d'antitoxine. Il faudra donc, dans le cas particulier que nous venons d'envisager, attendre le temps nécessaire à l'élimination de l'antitoxine avant d'injecter l'anatoxine. Il est un autre cas qui mérite d'être envisagé. C'est celui où un cheval, ayant reçu une première injection d'anatoxine est victime, avant de recevoir la deuxième, d'un accident entraînant habituellement l'emploi du sérum antitétanique. La première injection n'ayant, nous l'avons fait assez remarquer, aucune efficacité préventive, le vétérinaire se trouve dans l'obligation de faire une injection de sérum. L'injection, ainsi pratiquée, détruira-t-elle l'effet de la première dose d'anatoxine sur l'organisme ? Bien que cette question soit d'importance assez secondaire et d'intérêt surtout théorique nous avons cherché à l'élucider.

4 chevaux : 1, 2, 3 et 4, reçoivent chacun 10 c. c. d'anatoxine ; puis nous injectons le lendemain à 1 et à un cheval témoin, le surlendemain à 2, 10 c. c. de sérum antitétanique. Nous nous sommes assuré par une saignée antérieure, qu'aucun de ces chevaux n'avait la moindre trace d'antitoxine dans ses humeurs. Par des saignées et des titrages successifs nous étudions chez le témoin l'élimination de l'antitoxine. Au bout de deux mois ce cheval ainsi que les chevaux 1 et 2 en possèdent encore des traces. Nous injectons alors aux chevaux 1, 2 et 3 une deuxième dose d'anatoxine de 20 c. c. cette fois. Le cheval 4 ne reçoit rien. Sept jours seulement après cette deuxième injection d'anatoxine, les chevaux 1, 2 et 3 fournissent un sérum qui neutralise plusieurs doses mortelles de toxine au centimètre cube. Le sérum du cheval 4 ne renferme pas la moindre trace d'antitoxine.

Ainsi, *une injection de sérum antitétanique n'entrave en rien les effets d'une injection d'anatoxine faite 24 ou 48 heures auparavant*. Les traces d'antitoxine qui ont persisté à la suite de cette injection sérique n'ont eu aucune action inhibitrice vis-à-vis de la deuxième injection d'anatoxine. Il semble que, si, chez le cheval, l'apparition de l'antitoxine est lente à se manifester, la fixation de l'anatoxine dans son organisme soit cependant assez rapide. Bien que les applications de cette notion ne semblent pas, pour le moment, devoir être fréquentes, nous n'avons pas cru inutile de la mettre en relief.

3) Le Milieu. Nous ne signalerons que l'action de la température. Elle est d'ailleurs, à notre avis, à peu près nulle. Cependant les très grandes chaleurs comme les très grands froids, par l'action déprimante qu'ils peuvent exercer sur l'organisme, sont susceptibles d'entraver l'immunisation. Nous tenons de feu A. PRÉVOT cette observation que les chevaux immunisés en hiver donnent de moins bons sérums que ceux que l'on prépare par des températures plus clémentes. Notre expérience personnelle, assez courte il est vrai, ne nous a jamais permis d'en faire la vérification.

Remarquons à ce sujet que les trois chevaux dont nous avons relaté récemment l'histoire (anciens producteurs d'antitoxine diphtérique) (p. 72) étaient placés lors de leur immunisation et dans les jours qui ont suivi l'injection d'épreuve, dans des conditions de confort assez précaires, exposés au vent et au froid. La température, particulièrement rigoureuse à ce moment-là, resta cependant plusieurs jours inférieure à -10° .

Peut-être y a-t-il intérêt à s'abstenir de vacciner par les grands froids et au moment des fortes chaleurs.

1) INDICATIONS GÉNÉRALES RELATIVES A LA VACCINATION DES SOLIPÈDES

Les blessures ou interventions chirurgicales susceptibles d'être le point de départ du tétanos sont fréquentes chez le cheval ; aussi l'emploi du sérum antitétanique est-il, depuis longtemps, un acte banal de la pratique vétérinaire. C'est la fréquence même de cette intervention qui nous a fait penser à préconiser, au moins pour une certaine catégorie de chevaux, sinon pour tous, l'immunisation active, capable, à notre avis, de procurer une sécurité encore plus grande que la sérothérapie, quelle que puisse être l'efficacité de celle-ci. Certaines données relatives à la rapidité avec laquelle l'organisme du cheval peut produire certains anticorps avaient pu laisser croire, *à priori*, qu'on pourrait arriver à vacciner très rapidement le cheval contre le tétanos. Il aurait suffi, dans ces conditions, de faire une injection d'anatoxine tétanique à l'occasion de tout traumatisme suspect pour prévenir à coup sûr l'éclosion du tétanos. De même une injection d'anatoxine, faite dès la naissance, préviendrait contre tout risque de tétanos ombilical. Mais nous avons établi très nettement au cours de cette étude qu'il ne faut pas compter sur une seule injection d'anatoxine pour conférer l'immunité et que le laps de temps minimum indispensable à la constitution de celle-ci excède très notablement la durée de la période d'incubation du tétanos qui est en moyenne de six à neuf jours chez le cheval.

C'est donc délibérément qu'il faut abandonner cette idée de la substitution pure et simple de l'injection d'anatoxine à l'injection de sérum, en cas d'accident.

La vaccination antitétanique ne saurait donc être une intervention d'urgence et les indications de la sérothérapie restent entières en cas de traumatisme accidentel ou chirurgical chez un sujet neuf.

Il n'en va pas de même chez les sujets antérieurement vaccinés; chez ceux-là, une injection d'anatoxine, pratiquée à l'occasion d'une blessure, renforcera très utilement leur résistance. Quant aux nouveaux nés, il y aura lieu de rechercher s'ils peuvent tenir de leur mère, vaccinée ou revaccinée *pendant la gestation*, une immunité suffisante. Dans le cas où cette immunité n'aurait pas un caractère purement passif, peut-être une injection d'anatoxine serait-elle avantageusement pratiquée.

Quels sujets conviendra-t-il de vacciner ? Tous en principe, répondrons-nous. Nous ferons cependant parmi eux deux catégories: l'une comprendra les sujets pour lesquels la vaccination nous apparaît impérieusement nécessaire et, en quelque sorte, obligatoire, l'autre comprendra les sujets pour lesquels cette nécessité est moins urgente.

Devront être vaccinés : tous les chevaux d'une armée en campagne, sans aucune espèce d'exception, tous les chevaux des régions où le tétanos est particulièrement fréquent, tous ceux que leur service expose à des blessures fréquentes et particulièrement suspectes : chevaux charriant des gadoues ou immondices, chevaux circulant habituellement dans des chantiers de démolitions ainsi que les chevaux porteurs de plaies fistuleuses persistantes;

Pourront être vaccinés : tous les autres chevaux, en particulier quelque temps avant une intervention chirurgicale telle que castration, amputation de la queue, cautérisation, etc...

La morbidité par tétanos déjà considérablement ré-

duite du fait de la sérothérapie, le serait encore bien davantage si la vaccination était systématiquement et judicieusement pratiquée.

g) TECHNIQUE DE CETTE VACCINATION

Chez le cheval, pratiquer aseptiquement et en une région où ne porte pas le harnachement, à l'encolure par exemple, une injection sous-cutanée de 10 c. c. d'anatoxine. Faire, trois semaines ou un mois plus tard et dans les mêmes conditions, une deuxième injection de 10 c. c.

On utilisera de la même manière les antigènes au tapioca.

L'immunité peut être considérée comme acquise de 10 à 15 jours après la deuxième injection.

Le choix de la saison à laquelle on peut vacciner est indifférent.

VII

CONCLUSIONS

1) Un phénomène, analogue à celui que RAMON a découvert puis décrit sous le nom de FLOCCULATION dans les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques, apparaît au sein des mélanges de toxine tétanique et du sérum correspondant, effectués en de convenables proportions.

2) Rigoureusement spécifique, cette réaction peut servir à identifier l'un par l'autre, *in vitro*, la toxine tétanique et le sérum antitétanique.

3) La valeur flocculante d'une toxine tétanique correspond très exactement à sa valeur antigène. Cette valeur antigène est absolument indépendante de la toxicité de toxine.

4) Par un traitement approprié (emploi du formol et de la température de l'étuve) on peut enlever à la toxine tétanique toute sa toxicité en lui laissant cependant son pouvoir flocculant et le pouvoir antigène qui va de pair avec lui. La toxine ainsi transformée constitue l'*anatoxine tétanique*.

5) L'anatoxine tétanique est donc un antigène atoxique dont les propriétés immunisantes peuvent être très

exactement évaluées, *in vitro*, par la réaction dite de *floculation*.

6) L'anatoxine est parfaitement inoffensive, aussi bien pour les porteurs de spores tétaniques que pour les sujets sains et normaux. Elle ne détermine pas d'accidents d'anaphylaxie.

7) L'anatoxine tétanique est un antigène stable. Elle se conserve longtemps et sa résistance à la chaleur permet de la tyndalliser sans altérer aucunement ses propriétés immunisantes.

8) L'immunisation du cobaye, si malaisée à réaliser d'ordinaire, s'obtient très facilement au moyen de l'anatoxine tétanique.

9) L'immunité antitétanique s'accompagne, chez le cobaye, d'une production d'antitoxine dont l'abondance est en rapport avec la valeur de la résistance conférée.

10) La valeur de l'immunité du cobaye dépend, à la fois, de la quantité d'anatoxine utilisée et du nombre d'injections pratiquées.

11) L'immunité du cobaye contre le tétanos s'établit lentement et s'accroît progressivement pendant plusieurs semaines.

12) La meilleure voie d'introduction de l'anatoxine, et la plus commode, pour immuniser le cobaye est la voie sous-cutanée.

13) La voie intracérébrale permet de conférer l'immunité au cobaye et de lui faire produire en abondance de l'antitoxine.

14) On peut toujours vacciner le cheval au moyen d'une dose unique, massive, d'anatoxine (200 à 800 c. c.), mais l'injection d'une dose unique réduite (5 à 20 c. c.), ne lui confère que très exceptionnellement l'immunité.

15) Pratiquement, l'immunisation du cheval sera réalisée par l'injection de deux doses successives de 10 c. c. d'anatoxine.

16) Un tel traitement développe chez le cheval une immunité qui lui permet de résister soit à une intoxication pure par la toxine tétanique, soit à une inoculation de matières virulentes réalisant les conditions étiologiques les plus sévères de la maladie naturelle.

17) Le délai à ménager entre les deux injections vaccinales ne sera jamais inférieur à quatorze jours. Il y aura avantage, en effet, à le porter à trois ou mieux à quatre semaines.

18) L'immunité du cheval pourra être considérée comme acquise de dix à quinze jours après la deuxième injection d'anatoxine.

19) Le cheval immunisé par l'anatoxine a toujours dans ses humeurs de l'antitoxine titrable.

20) Cette antitoxine n'assure une protection efficace qu'à la condition d'être assez abondante. Un cheval activement immunisé dont le sérum neutralise parfaitement, à raison de 1 c. c., une seule dose mortelle de toxine tétanique pour le cobaye résiste à l'infection tétanique naturelle la plus sévère.

21) On peut renforcer considérablement la valeur immunisante d'une anatoxine tétanique en lui ajoutant de la poudre de tapioca stérilisée. On obtient ainsi, au prix d'une intense réaction locale et à la faveur d'un retard dans la résorption de l'antigène, une résistance qui confine à l'hyperimmunité.

22) L'immunité antitétanique active du cheval a une durée au moins égale à une année.

23) Une deuxième vaccination pratiquée un an après la première, permet non seulement d'entretenir l'immunité, mais encore d'en accroître très considérablement la valeur.

24) Une injection d'antitoxine pratiquée postérieurement à une première injection vaccinante (même 24 heures après) n'entrave pas les effets de celle-ci.

25) Les sujets épuisés ou malades, ceux qui auront reçu récemment une injection d'antitoxine, létanique, seront écartés de la vaccination.

26) Le choix de la saison à laquelle on doit vacciner est indifférent.

27) La vaccination antitétanique n'est pas une intervention d'urgence, c'est une intervention de précaution. Jamais on ne substituera, chez un sujet neuf atteint d'une blessure suspecte, l'injection d'anatoxine à l'injection de sérum antitétanique. Les indications de la sérothérapie restent entières dans un tel cas.

28) Chez les sujets antérieurement vaccinés on pourra, au contraire, pratiquer avec avantage une injection d'anatoxine, de préférence à une injection de sérum, à l'occasion d'un traumatisme accidentel ou chirurgical.

29) On réduirait considérablement la morbidité par tétanos par l'application systématique et raisonnée de la méthode de vaccination que nous apportons et dont rien n'empêche d'étendre l'emploi à toutes les espèces sensibles au tétanos.

A. Garches, le 10 juin 1926.

Vu : le Doyen,
H. ROGER.

Vu : le Président,
A. LEMIERRE.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,
P. LAPIE.

VIII

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON. The antiseptic and germicidal properties of solutions of formaldehyd and its action upon toxines. (*Hyg. Lab. Bull.* N° 37, 1907).

ARONSON. Über die antiseptischen Eigenschaften des polymerisierten Alkools und die innerliche Anwendung desselben (*Verleine für innere Medizin*, 12 mars 1894. *Anal. in Münch. Med. Woch.* 1894).

BABES. Sur la vaccination par les toxines latentes contrebalancées par les antitoxines sanguines. (*Bull. Ac. Méd.* 1895, p. 402).

BASSET, MONVOISIN, PINCEMIN. Observations sur le tétanos expérimental du cheval. (*Bull. Soc. Centr. Méd. Vétér.* Nov. 1919).

BAZY. A propos du tétanos. (*C. R. Ac. Sc.* 14 Déc. 1924).

BEHRING. Über Immunisierung und Heilung von Versuchstieren beim Tetanus. (*Zeit. für Hyg.* 1892, p. 2).

BEHRING et KITASATO. Über das Zustandekommen des Diphtherie-immunität und des Tetanus-immunität bei Thieren. (*Deut. Med. Woch.* 1890, p. 1113).

BERARD et LUMIERE. Sur le tétanos tardif. (*Bull. Ac. Méd.* 1915, p. 234).

— Etudes sur le tétanos. (*Lyon chir.* 1915, p. 404 et 425).

— Récidives et rechutes du tétanos. (*Pres. Méd.* 25 juil. 1925).

BINOT. Etude expérimentale sur le tétanos. (*Thèse*, F. M. Paris 1899).

BOLLINGER. Recovery from second attack of tetanus. (*Am. Vet. Rew.*, avril 1909).

BRIEGER, KITASATO und WASSERMANN. Über Immunität und Giftfestigung. (*Zeit. für Hyg.* 1892, p. 137).

BURCKHARD. Zwei Beiträge zur Kenntniss des Formalinwirkungs. (*Centr. für Bakt.* 1895, p. 257).

BUXTON. Immunisation active du cheval contre le tétanos. (*Veter. journ. Anal. in Berl. Thier. Woch.* 1923, p. 18).

COURMONT et CORDIER. Deux cas de tétanos chez le même sujet à cinq ans de distance. (*Lyon Méd.*, 4 déc. 1910).

COURMONT et DOYON. Le tétanos. (J. B. Baillière 1900).

DESCOMBEY. L'anatoxine tétanique. (*C. R. Soc. Biol.* 1924, p. 239).

— Vaccination du cobaye par injection intra-cérébrale d'anatoxine tétanique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 482).

— Vaccination du cheval par l'anatoxine tétanique (*Ann. Inst. Past.* 1925, p. 485).

— Sur l'immunisation antitétanique du cheval. Durée de l'immunité. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, p. 253).

— Sur l'immunisation antitétanique du cheval. Effet des injections d'anatoxine sur des sujets antérieurement vaccinés. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, p. 315).

— Voir Ramon et Descombey.

EISLER. Über Immunisierung mit durch Formaldehyd veränderten Tetanustoxin. (*Wien. Klin. Woch.* 1915, p. 1223).

EISLER und LOWENSTEIN. Über Formalinwirkung auf Tetanustoxin und andere Bakteriengifte. (*Centr. für Bakt. Orig.* 1912, p. 271).

— Immunisierung mit Tetanustoxin - Antitoxingemischen. (*Centr. für Bakt. Orig.* 1915, T. 75, p. 348).

EISLER und SILBERSTEIN. Ein Beitrag zur Gewinnung von Tetanusserum. (*Zeit. für Hyg.* 1919, p. 29).

GUILLAUMIN. Récidive du tétanos. (*Rec. d'Hyg. et de Méd. Vétér. Mil.* 3^e Série 1905, T. VI).

JASME. A triple attack of tetanus in a mule. (*Am. Veter. Rew.* Nov. 1904).

KRAUS. Über Immunisierung mit Toxoiden des Tetanustoxins. (*Wien. Klin. Woch.* 1924, p. 1059).

LOWENSTEIN. Über aktive Schutzimpfung beim Tetanus durch Toxoide. (*Zeit. für Hyg.* 1909, T. 62, p. 461).

— Beitrag zur Frage der aktiven Schutzimpfung beim Meerschweinschen mittelst ungiftigen Tetanustoxin. (*Wien. Klin. Woch.* 1916, p. 514).

— Über Tetanus Schutzimpfung. (*Wien. Klin. Woch.* 1916, p. 515).

MARIE. Les travaux récents sur les toxines diphtérique et tétanique. (*Revue. Bull. Inst. Past.* 1913, p. 473 et 521).

MARTIN, FRASEY, SALIMBENI. Essais sur la vaccination antitétanique des chevaux par la toxine tétanique chauffée. (*C. R. Soc. Biol.* 1914, p. 567).

MARTIN, A. PREVOT et G. LOISEAU. Examen comparatif des pouvoirs agglutinants et antitoxiques des serums antidiphtériques; leur valeur thérapeutique. (*C. R. Soc. Biol.* 1910, p. 1128).

MOUGNEAU. Récidive du tétanos. (*Rev. Gén. Méd. Véter.* 1903, p. 471).

NEUCKI, SIEBER et SCHOUROW SIMANOWSKI. Die Entgiftung der Toxine durch die Verdauungssäfte. (*Centr. für Bakt.* T. 96, p. p. 840 et 880).

NICOLLE (M). Les antigènes et les anticorps. (Masson 1919).

NICOLLE, CESARI et JOUAN. Toxines et antitoxines. (Masson 1919).

NICOLLE et TRUCHE. Notes sur la conservation des toxines solubles. (*Ann. Inst. Past.* 1910, p. 921 et 1912, p. 1030).

NOCARD et LECLAINCHE. Les maladies microbiennes des animaux. 3^e Edition. Article « Tétanos ». (Masson 1903).

OKUDA. On the prophylactic value of iodized tetanus toxin.
(*Jour. Japan. Soc. Veter. Sc.*, mars 1923).

RAMON. Flocculation dans un mélange neutre de toxine et d'antitoxine diphtériques. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, p. 661).

— Sur une technique de titrage « in vitro » du sérum antidiphtérique. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, p. 711).

— A propos du titrage « in vitro » du sérum antidiphtérique. (*C. R. Soc. Biol.* 1922, p. 813).

— Sur la concentration du sérum antidiphtérique et l'isolement de l'antitoxine. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, p. 167).

— Pouvoir flocculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique. (*C. R. Soc. Biol.* 1923, p. 2).

— La flocculation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine diphtériques. (*Ann. Inst. Past.* 1923, p. 1001).

— Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue atoxique. (Anatoxine). (*C. R. Ac. Sc.* 1923, p. 1338).

— Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtériques. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. (*Ann. Inst. Past.* 1924, p. 1).

— Des anatoxines. (*C. R. Ac. Sc.* 1924, p. 1436).

— Sur les propriétés de l'anatoxine diphtérique. (*C. R. Ac. Sc.* 1924, p. 422).

— Sur l'apparition des anticorps. (*C. R. Ac. Sc.* 1924, p. 485).

— Sur l'anatoxine diphtérique et sur les anatoxines en général. (*Ann. Inst. Past.* 1925, p. 1).

— Sur le contrôle et la mesure des propriétés de l'anatoxine diphtérique. (*Bull. Ac. Méd.* 1925, p. N° 6).

— Sur l'anatoxine diphtérique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 1432).

— Sur la production des antitoxines. (*C. R. Ac. Sc.* 1925, p. 157).

— Sur la production de l'antitoxine diphtérique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 506).

— Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphtérique. (*Bull. Soc. Centr. Méd. Vétér.* 1925, p. 227).

— Sur un procédé d'immunisation antitoxique et de production des antitoxines. (*Bul. Soc. Centr. Méd. Vétér.* 1926, p. 348).

— Procédé pour accroître la production des antitoxines. (*Ann. Inst. Past.* 1926, p. 1).

RAMON et BERTHELOT. Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines. (*C. R. Ac. Sc.* 1925, p. 340).

RAMON et DESCOMBEY. Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 508).

— Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 898).

— Sur l'appréciation de la valeur antigène de la toxine et de l'anatoxine tétaniques par la méthode de floculation. (*C. R. Soc. Biol.* 1926, p. 434).

RAMON et LAFFAILLE. Sur l'immunisation antitétanique. (*C. R. Soc. Biol.* 1925, p. 582).

RAMON et ZOELLER. De la valeur antigène de l'anatoxine tétanique chez l'homme. (*C. R. Ac. Sc.* 1925, p. 485).

— Les conditions biologiques de la vaccination antitétanique chez l'homme. (*Bull. Ac. Méd.* 2 fév. 1926).

ROSENAU et ANDERSON. The standardization of the tetanus antitoxin (*Hyg. Lab. Bull.* 1907).

ROUX et BORREL. Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos. (*Ann. Inst. Past.* 1898, p. 225).

ROUX et MARTIN. Contribution à l'étude de la diphtérie. (Sérum-thérapie). (*Ann. Inst. Past.* 1894, p. 609).

TIZZONI et CATTANI. Sur la manière de conférer aux animaux l'immunité contre le tétanos. (*Centr. für Bakt.* 1891, p. 189).

TAPPEINER et IODBLAUER. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Diphtherietoxin und Tetanustoxin. (*Münch. Med. Woch.* 1904, p. 737).

VAILLARD. Sur l'immunité contre le tétanos. (*C. R. Soc. Biol.* 1891, p. 147).

— Sur les propriétés du sérum des animaux rendus réfractaires au tétanos. (*C. R. Soc. Biol.* 1891, p. 462).

— Sur l'inoculation du bacille tétanique dépourvu de toxine. (*C. R. Soc. Biol.* 1891, p. 623).

— Contribution à l'étude du tétanos. (*Ann. Inst. Past.* 1892, p. 224).

— De l'action des humeurs d'un animal immunisé contre le tétanos sur le virus de cette maladie. (*Ann. Inst. Past.* 1892, p. 676).

VAILLARD et ROUGET. Contribution à l'étude du tétanos. (*Ann. Inst. Past.* 1891, p. 1).

VAILLARD et VINCENT. Contribution à l'étude du tétanos. (*Ann. Inst. Past.* 1891, p. 1).

VALLÉE et BAZY. Sur la vaccination active de l'homme contre le tétanos. (*C. R. Ac. Sc.* 1917, p. 1019).

— Sur la vaccination active de l'homme contre le tétanos chez le blessé de guerre. (*Bull. Soc. Chir.*, 27 juin 1917).

VERNONI. Sur le tétanos récidivant à la suite de blessures de guerre. (*Gaz. degli Osped. e delle Clin.* 1917, N° 70. *Anal. in Pres. Méd.* 1918, p. 448).

VINCENT. Contribution à l'étude du tétanos dit « médical » ou « spontané ». Influence de la chaleur. (*Ann. Inst. Past.* 1904, p. 450).

— Tétanos et Quinine. (*Ann. Inst. Past.* 1904, p. 748).

— Nouvelles recherches sur l'étiologie du tétanos dit « médical ». (*Bull. Ac. Méd.* 1907, p. 390).

— Etiologie et prophylaxie de certains cas de tétanos. (*Bull. Ac. Méd.* 1907, p. 233).

ZOELLER et RAMON. L'immunité antitétanique par l'anatoxine chez l'homme (*Pres. Méd.* 1926, p. 485).

LE PUY-EN-VELAY. — IMPRIMERIE « LA HAUTE-LOIRE »
